

# FTIR-spektroskopische Untersuchungen zum Aktivierungsmechanismus von bovinem und humanem Rhodopsin

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biophysik

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

**Diplom Biophysiker Roman Kazmin**

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Franz J. Bartl
2. Prof. Dr. Peter Hegemann
3. Prof. Dr. Andreas Möglich

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2015





## ZUSAMMENFASSUNG

Das aus dem Apoprotein Opsin und dem kovalent gebundenen Liganden bestehende Rhodopsin dient als Modellsystem für den Aktivierungsmechanismus der größten Klasse von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Infolge einer photochemischen Reaktion vollführt Rhodopsin eine Bewegungsabfolge von Sekundärstrukturelementen, wodurch es aktiviert wird, das G-Protein bindet und den Stimulus auf zellinterne Signalwege überträgt.

Mithilfe der ortsspezifischen Mutagenese wurden Mutanten des bovinen Rhodopsins erzeugt, in eine künstliche Lipidumgebung eingelagert und hauptsächlich mittels FTIR-Spektroskopie untersucht.

Anhand der Y191F- und Y192F-Mutanten konnte die Translokation des transienten Gegenions der Schiffschen Base Glu181 während der Aktivierung bestimmt werden. Die Interaktionen des Tyr206 sind für die gekoppelte Bewegung von EL2 und TM5 mitbestimmend, was mittels Y206F-Mutante gezeigt wurde.

Eine markante Anhäufung von Methioninen auf der cytoplasmatischen Seite des Rezeptors ist u.a. für das Ausklappen der TM6 zuständig. Diese Bewegung ist wichtige Determinante der Rezeptoraktivierung. Hierfür wurden insgesamt fünf Mutanten verwendet.

Im zweiten, hauptsächlichen Teil der Arbeit wird das bislang kaum untersuchte humane Rhodopsin mit dem bovinen Rezeptor verglichen. Ausgehend von verschiedenen Dunkelzuständen, konnte gezeigt werden, dass die Aktivierungsmechanismen beider Rezeptoren voneinander divergieren, um letztlich bei der Bildung der aktiven Spezies wieder zu konvergieren. Über die Analyse der Aminosäuresequenzen der Mammalia-Rhodopsine wurden zwei Bereiche hoher Variabilität identifiziert, die u.a. die molekulare Ursache für diese Diskrepanzen liefern. Diese Feststellung wurde mit human-bovinen-Rhodopsinchimären bewiesen. Ergänzend zu dieser Studie wurde Schafsrhodopsin einem Vergleich sowohl mit bovinem als auch mit humanem Rezeptor unterzogen. Es zeigte, als eine weitere natürlich vorkommende Variante des Lichtrezeptors, einen eigenständigen Weg der Aktivierung.



## ABSTRACT

Rhodopsin, which consists of the apoprotein opsin and its covalently bound ligand, is used as a model system to understand the activation mechanism of the large family of G protein coupled receptors (GPCRs). As a result of a photochemical reaction, rhodopsin undergoes activating structural changes, enabling it to bind the G protein and transmitting the stimulus to intracellular signaling pathways.

In the first part of this work, site-directed mutants of bovine rhodopsin were produced, incorporated into an artificial lipid environment, and studied mainly by FTIR spectroscopy. The translocation of the transient Schiff base counterion (Glu181) during the activation process was determined using the Y191F- and Y192F-mutants. The interactions of Tyr206 contributed to the coupled movement of EL2 and TM5, which was shown by Y206F-mutant.

A striking accumulation of methionines on the cytoplasmic side of the receptor was observed to be a key-player for the activating outward motion of TM6.

In the second and primary part of this work, human rhodopsin, which has been rarely studied, was compared with the bovine receptor. Starting from various dark states, it was shown that the activation mechanisms of both receptors diverge from each other and yet ultimately converge in the formation of the active species. By analyzing the amino acid sequences of mammalian rhodopsins, two regions of high variability were identified, which provide the molecular basis for these discrepancies. This finding was verified by the investigation of human/bovine rhodopsin chimeras. In addition to this study, ovine rhodopsin was compared with both the bovine and human forms. It showed, as another naturally occurring variant of the light receptor, an independent pathway of activation.



# Inhalt

<b>1</b>	<b>EINFÜHRUNG</b>	<b>1</b>
1.1	ZELLULÄRE ORGANISATION	2
1.2	AUFBAU DER ARBEIT	3
1.3	AKTIVIERUNGSMECHANISMUS DES RHODOPSINS	4
1.4	G-PROTEIN-GEKOPPELTE SIGNALTRANSDUKTION	6
1.5	FUNKTIONELLE BEREICHE	8
1.5.1	Die Bindungstasche	10
1.5.2	Die Schiffische Base	10
1.5.3	TM3-TM5-Netzwerk	11
1.5.4	Extrazellulärer Loop 2	12
1.5.5	Cytoplasmatische Seite	13
1.5.5.1	D(E)RY-Motiv	14
1.5.5.2	Y(x)7K(R)-Motiv (Y223)	14
1.5.5.3	NPxxY(x)5,6F-Motiv	15
1.5.6	Wasser	15
1.5.7	Methionin-Cluster	16
1.5.8	Tyrosine	18
1.5.8.1	Tyrosine 191 und 192 aus dem EL2	19
1.5.8.2	Tyrosin 206 aus der TM5	21
1.6	HUMANES RHODOPSIN	22
1.6.1	Sequenzieller Vergleich	24
1.6.2	Retinitis pigmentosa	26
1.7	SCHAFSRHODOPSIN	27
<b>2</b>	<b>METHODEN UND TECHNIKEN</b>	<b>29</b>
2.1	PROBENHERSTELLUNG	29
2.1.1	Ovines Rhodopsin	32
2.2	SPEKTROSKOPIE	33
2.2.1	Infrarot-Spektroskopie	33
2.2.2	FTIR-Spektroskopie	34
2.2.3	FTIR an Proteinen	35
2.2.4	Methoden der FTIR-Spektroskopie	36
2.2.5	Differenz-Spektroskopie	37
2.2.6	Normierung der Spektren	38
2.2.7	Extra-Meta II-assay	39
2.2.8	Andere Hilfsmittel	39
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>41</b>
3.1	METHIONIN-CLUSTER	41
3.1.1	Metarhodopsin I	42
3.1.2	Metarhodopsin II	44
3.1.3	Fazit	47
3.2	TYROSINE	47
3.2.1	Bathorhodopsin	48
3.2.2	Lumirhodopsin	51
3.2.3	Metarhodopsin I	54
3.2.4	Metarhodopsin II	57
3.2.5	Doppelmutante Y191F/Y223F	60

3.2.6	Fazit.....	63
3.3	HUMANES RHODOPSIN.....	63
3.3.1	Bathorhodopsin.....	64
3.3.2	Lumirhodopsin.....	65
3.3.3	Spektren bei -40°C.....	65
3.3.4	Metarhodopsin I.....	67
3.3.5	Human-bovine-Chimären, Metarhodopsin I.....	69
3.3.6	Blitzlichtphotolyse.....	70
3.3.7	Meta I – Meta II-Übergang.....	71
3.3.8	Metarhodopsin II.....	72
3.3.9	Meta IIc und pbs.....	73
3.3.10	G-Protein-Aktivierung.....	74
3.3.11	Fazit.....	75
3.4	OVINES RHODOPSIN.....	76
3.4.1	Bathorhodopsin.....	76
3.4.2	Lumirhodopsin.....	78
3.4.3	Metarhodopsin I.....	79
3.4.4	Meta I / Meta II-Gleichgewicht.....	80
3.4.5	Metarhodopsin II.....	82
3.4.6	Fazit.....	83
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>85</b>
4.1	BOVINES RHODOPSIN.....	85
4.1.1	Auswertung.....	85
4.1.2	Schlussfolgerung.....	92
4.1.3	Zusammenfassung.....	93
4.2	HUMANES RHODOPSIN.....	94
4.2.1	Auswertung.....	94
4.2.2	Ovines Rhodopsin.....	102
4.2.3	Schlussfolgerung.....	103
4.2.4	Zusammenfassung.....	104
<b>5</b>	<b>AUSBLICK.....</b>	<b>107</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>109</b>
<b>7</b>	<b>LISTE DER VERÖFFENTLICHUNGEN.....</b>	<b>113</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>115</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>126</b>

## Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1.1: Zelluläre Organisation des Lichtrezeptors.....	2
Abbildung 1.2: UV-Vis-Absorptionsspektrum von dunkeladaptiertem und belichtetem Rhodopsin.....	4
Abbildung 1.3: Photoreaktion des Rhodopsins.....	5
Abbildung 1.4: Kristallstruktur des Rhodopsins eingebettet in Lipidbilayer.....	8
Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Bindungstasche.....	10
Abbildung 1.6: Der extrazelluläre Loop 2.....	13
Abbildung 1.7: Proteinogenes L-Methionin.....	16
Abbildung 1.8: Methionin-Cluster.....	17
Abbildung 1.9: Proteinogenes L-Tyrosin.....	18
Abbildung 1.10: Glutaminsäure 181 im Grundzustand.....	20
Abbildung 1.11: Detaillierte Darstellung des Bereiches um das Tyr206.....	21
Abbildung 1.12: Alinierung der Aminosäuresequenzen vom humanen und bovinen Rhodopsin.....	23
Abbildung 1.13: 23 Unterschiede zwischen humanem und bovinem Rhodopsin.....	24
Abbildung 1.14: Sequenzbereiche größter Diskrepanz.....	25
Abbildung 1.15: TEC- und SB-Regionen der Mammalia.....	26
Abbildung 1.16: Alinierung der Aminosäuresequenzen von bovinem, humanem und ovinem Rhodopsin.....	28
Abbildung 2.1: Verteilung der Fettsäurereste.....	30
Abbildung 3.1: $\Delta 309$ - und M309A-Mutanten unter Meta I-Bedingungen.....	42
Abbildung 3.2: $\Delta 308$ /M309A-, M253A- und M257C-Mutanten unter Meta I-Bedingungen.....	43
Abbildung 3.3: M309A- und M253A-Mutanten unter Meta II-Bedingungen.....	45
Abbildung 3.4: $\Delta 309$ -, $\Delta 308$ /M309A- und M257C-Mutanten unter Meta II-Bedingungen.....	46
Abbildung 3.5: Tyrosin-Mutanten unter Batho-Bedingungen (80K).....	49
Abbildung 3.6: 80K-Spektrum der Y192F-Mutante.....	50
Abbildung 3.7: Tyrosin-Mutanten unter Lumi-Bedingungen (173K).....	52
Abbildung 3.8: 173K-Spektrum der Y192F-Mutante.....	53
Abbildung 3.9: Tyrosin-Mutanten unter Meta I-Bedingungen.....	56
Abbildung 3.10: Temperatur- und pH-Wert-Abhängigkeit der Y191F-Mutante.....	58
Abbildung 3.11: Y192F- und Y206F-Mutanten unter Meta II-Bedingungen.....	59
Abbildung 3.12: Y191F/Y223F - Doppelmutante bei 0°C.....	61
Abbildung 3.13: Y191F/Y223F - Doppelmutante bei 30°C.....	62
Abbildung 3.14: Batho- und Lumi-Spektren vom humanem Rhodopsin.....	64
Abbildung 3.15: Bovines Rhodopsin bei 233K (-40°C).....	66
Abbildung 3.16: Humanes Rhodopsin unter Meta I-Bedingungen.....	67
Abbildung 3.17: Human-Bovine-Chimären unter Meta I-Bedingungen.....	70
Abbildung 3.18: Blitzlichtphotolyse.....	71
Abbildung 3.19: pH-Titration bei 20°C.....	72
Abbildung 3.20: Humanes Rhodopsin unter Meta II-Bedingungen.....	73
Abbildung 3.21: Peptidinduzierte Bildung der aktiven Spezies.....	74
Abbildung 3.22: G-Protein Aktivierung.....	75
Abbildung 3.23: Bathospektrum des ovinen Rhodopsins.....	76
Abbildung 3.24: Vergrößerte Darstellung des Bathospektrums.....	77

Abbildung 3.25: Lumispektrum des ovinen Rhodopsins.....	78
Abbildung 3.26: Meta I-Spektrum des ovinen Rhodopsins.....	80
Abbildung 3.27: pH-Wert-Abhängigkeit des ovinen Rhodopsins bei 0°C.....	81
Abbildung 3.28: Meta II-Spektrum des ovinen Rhodopsins.....	82
Abbildung 4.1: Interaktionspartner von Glu181 im Grundzustand.....	86
Abbildung 4.2: Interaktionspartner von Tyr268.....	88
Abbildung 4.3: Ausklappen der sechsten TM im aktiven Zustand.....	91
Abbildung 4.4: Alinierung aller z. Zt. vorhandenen Säuger-Rhodopsine.....	97
Abbildung 4.5: Region um die Position 298.....	100
Abbildung 4.6: Clusteranalyse der TEC-Region.....	101
Abbildung 6.1: Alinierung der Rhodopsinsequenzen.....	109
Abbildung 6.2: Sekundärstruktur, Clusteranalyse und Wasserstoffbrücken der TEC- Region in den MD-Simulationen.....	111



## Verzeichnis der Abkürzungen

Batho	Bathorhodopsin
BTP	Bis-tris-Propan
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
DDM	n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid
<sub>dd</sub> Bande	Doppeldifferenzbande
<sub>dd</sub> Spektrum	Doppeldifferenzspektrum
DTT	Dithiothreitol
EL	Extrazelluläre Loop
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein coupled receptor
GTP	Guanosintriphosphat
H	Helix
HOOP	Hydrogen out of plane
Lumi	Lumirhodopsin
Meta	Metarhodopsin
NMR	Nuclear magnetic resonance
OG	n-D-Octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside
pbs	Peptide binding spectra
pdb	Protein data base
PDE	Phosphodiesterase
RP	Retinitis pigmentosa
SB	Schiffsche Base
svd	Singular value decomposition
TM	Transmembrane Helix
UV-Vis	Ultraviolet-visible
WT	Wildtyp
<sub>wt</sub> Spektrum	Spektrum des Wildtyps
WM	Washed membrane



## 1 EINFÜHRUNG

Ein Großteil der Kommunikation in einem biologischen Organismus sowie dessen Interaktion mit der Umwelt wird mithilfe von Rezeptoren und Botenstoffen bewerkstelligt. Die Funktion des Detektors wird dabei in den meisten Fällen von integralen Membranproteinen übernommen, die auf der einen Seite der Membran (extrazellulärer Raum, Umwelt) das Signal aufnehmen und über Konformationsänderungen der eigenen Struktur den Stimulus auf die intrazellulär gelegene Seite übertragen.

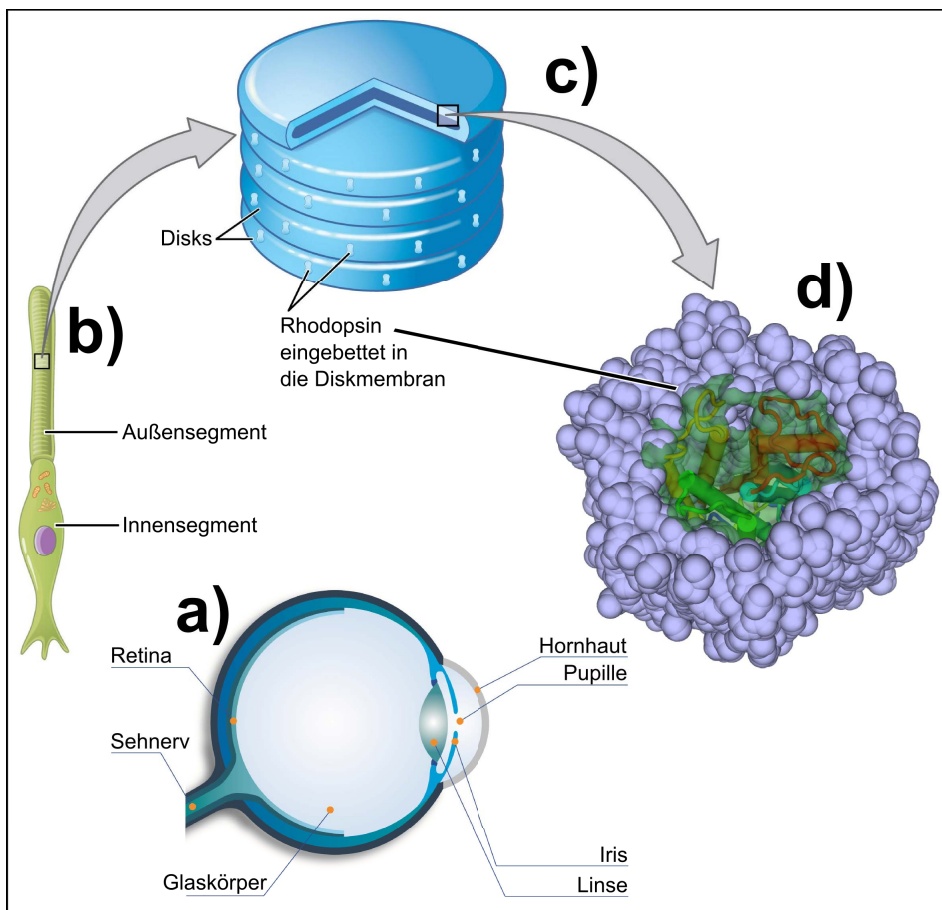
Die dabei an den Rezeptor gestellten Anforderungen sind ebenso vielfältig wie die Signale, die der Rezeptor zu detektieren vermag. Die Signalpalette erstreckt sich von elektromagnetischen Wellen über mechanische Wechselwirkungen bis hin zum hochkomplexen Gebiet der bio- und neurochemischen Relationen. Um dem gerecht zu werden, sollte der Rezeptor seinerseits

- a) kompakt sein, da so eine hohe Rezeptordichte ermöglicht werden kann, was wiederum einer effizienten Signalwahrnehmung gleichzusetzen ist.
- b) stabil bzw. rauscharm sein, um eine spontane Aktivierung des Rezeptors (etwa durch das natürliche Hintergrundrauschen) und damit Fehlsignale zu vermeiden.
- c) spezifisch sein, was soviel heißt, dass er möglichst nur mit einem bestimmten Liganden kompatibel ist
- d) schnell sein, denn ein Rezeptor ist letztendlich ein Transmitter, also nur das erste Glied einer komplexen und mehrstufigen Signaltransduktionskaskade.

Das biophysikalische Herangehen an die Vorgänge in einem Rezeptor und seine Funktionsweise stellen ein breites Gebiet der medizinischen Grundlagenforschung dar.

## 1.1 Zelluläre Organisation

Rhodopsin ist ein Lichtrezeptor, der im Auge der Vertebraten vorkommt (Abbildung 1.1a). Auf die genaue Anatomie des Augapfels soll hier nicht näher eingegangen werden. Erwähnenswert ist jedoch die Tatsache, dass das Auge an der der Linse entgegengesetzten Seite von innen mit einer Zellschicht, der Retina (oder Netzhaut) ausgekleidet ist. Diese verfügt über zwei verschiedene für die Detektion des sichtbaren Lichts optimierte Zelltypen, nämlich die Stäbchen und die Zapfen, wobei beide Zelltypen mit Rhodopsin denselben Rezeptor enthalten. Während Stäbchenzellen für das skotopische Sehen (unter Bedingungen geringer Lichtstärke) zuständig sind, beinhaltet das menschliche Auge im Normalfall drei Typen von Zapfenzellen, die bei Tageslicht aktiv werden (photopisches Sehen) [1]. Diese enthalten Rhodopsine unterschiedlicher



**Abbildung 1.1: Zelluläre Organisation des Lichtrezeptors**

**a)** Schematische Darstellung des Querschnitts eines menschlichen Auges mit den Markierungen der wichtigsten Bestandteile (svav.de). **b)** Schematische Darstellung einer Stäbchenzelle, unterteilt in das Innensegment mit allen Zellorganellen und das Außensegment mit den **c)** gestapelten Diskmembranen (cnx.org). **d)** In eine Membran (blaue Sphären) eingelagertes Rhodopsin-Molekül (grüne halbdurchsichtige Oberfläche mit den farblich markierten Helices (pbd: 1U19 [96])).

Absorptionsmaxima (S-Zapfen,  $\lambda_{\max}=420$  nm; M-Zapfen,  $\lambda_{\max}=534$  nm; L-Zapfen,  $\lambda_{\max}=564$  nm), die das Farbsehen ermöglichen [2, 3]. Rhodopsin ist der Archetyp einer der bedeutendsten und größten Klasse von Rezeptoren im menschlichen Körper. Hierbei handelt es sich um die Klasse A der G-Proteingekoppelten Rezeptoren, abgekürzt GPCR [4].

Die Stäbchenzellen der Vertebraten sind außerordentlich gut entwickelte Photodetektoren, die in der Lage sind, nicht nur durch einzelne Photonen getriggert zu werden, sondern auch sich an über hundertfach höhere Lichtintensitäten anpassen zu können [5]. Sie bestehen aus zwei Segmenten (Abbildung 1.1b), wobei das sogenannte Innensegment die gesamte Zellmaschinerie enthält, die für die normalen Zellfunktionen notwendig ist und mittels einer Synapse an die nächste Zellschicht (Bipolarzellen) angeknüpft ist. Das Außensegment der menschlichen Stäbchenzelle ist ca. 40  $\mu\text{m}$  lang und beinhaltet einen Stapel aus 1000-1500 flachen Membranvesikeln (genannt Disks, Abbildung 1.1c), von denen jedes einzelne bis zu  $10^5$  Rhodopsine (Abbildung 1.1d) beherbergt [5, 6].

## **1.2 Aufbau der Arbeit**

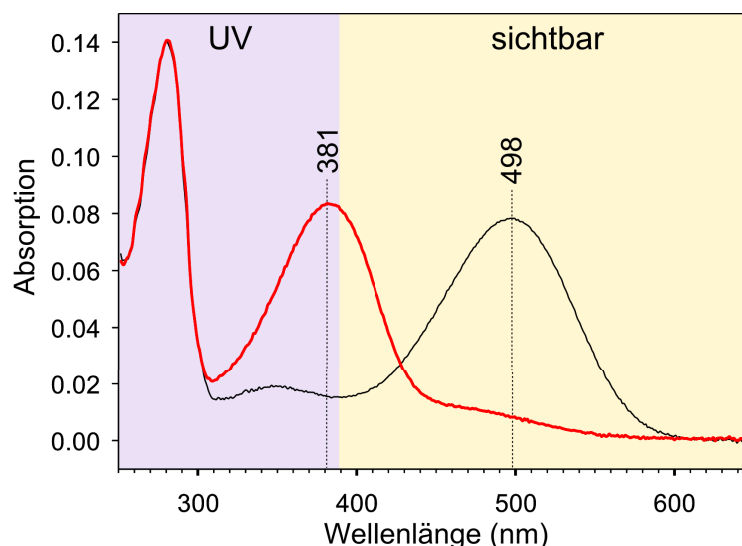
Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Aspekten des Aktivierungsmechanismus des Rhodopsins und setzt sich aus zwei Themengebieten zusammen, die einerseits zwar den gleichen Rezeptortyp behandeln, andererseits jedoch aus inhaltlichen Gründen separat dargestellt werden müssen. Im ersten Teil dieser Arbeit werden spektroskopische Untersuchungen an Mutanten des bovinen Rhodopsins abgearbeitet, wobei dieser Abschnitt seinerseits ebenfalls in zwei Unterkapitel aufgeteilt wird. Diese Unterkapitel umfassen zum einen die Untersuchungen zum sogenannten Methionin-Cluster auf der cytoplasmatischen Seite des Rezeptors, zum anderen werden die besonderen Funktionen der Tyrosinseitenketten im Rhodopsin behandelt, wobei, zum Teil basierend auf eigenen Vorarbeiten [7], Mutationen einiger Tyrosinseitenketten im Rhodopsin untersucht werden.

Das zweite große Themengebiet umfasst das künstlich hergestellte humane Rhodopsin sowie seine Chimären mit dem bovinen Rezeptor. Als eine Erweiterung der Studie über die Funktionsweise des humanen Rezeptors wurde aus

Schafsaugen gewonnenes Rhodopsin ebenfalls spektroskopisch untersucht und mit den humanen und bovinen Analoga verglichen. In diesen Abschnitt fließen neben spektroskopischen Methoden auch molekulare Modellierungen ein, die im Rahmen einer Kooperation mit der theoretischen Arbeitsgruppe am Institut entstanden sind.

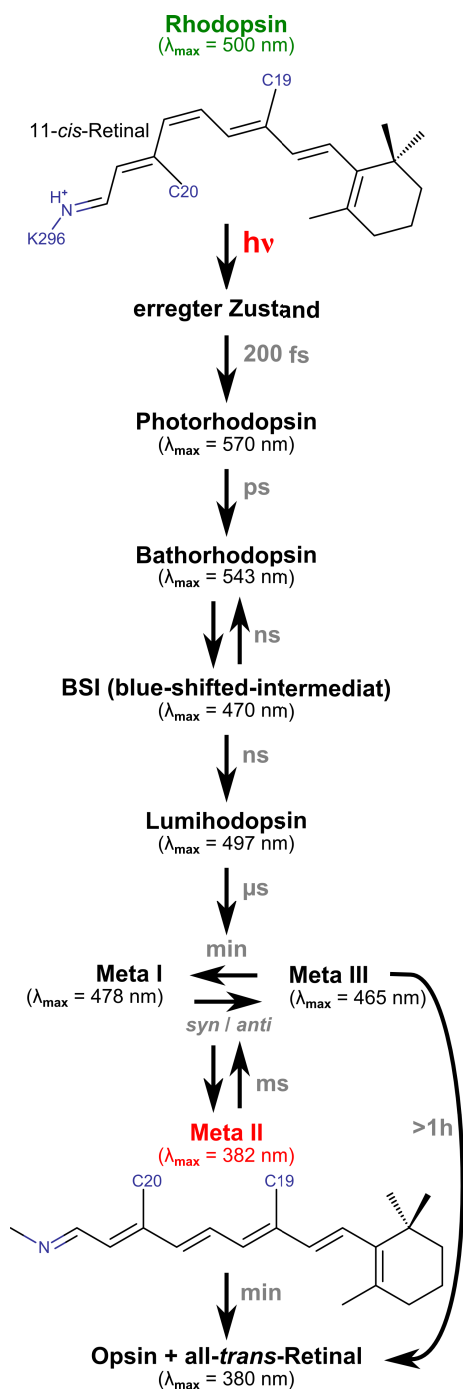
### 1.3 Aktivierungsmechanismus des Rhodopsins

Rhodopsin ist ein lichtempfindlicher transmembraner Komplex, bestehend aus dem Apoprotein Opsin und dem 11-*cis*-Retinal als Chromophor [8]. Die Verbindung der beiden Einheiten zum Holoprotein wird über die sogenannte Schiff'sche Base (SB) realisiert [9]. Hierbei erfolgt die Anknüpfung des Chromophors als prosthetische Gruppe an die  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins 296 [10]. In ihrer protonierten Form bewirkt diese Verbindung, dass das Absorptionsmaximum des Retinals aus dem ultravioletten ( $\lambda_{\text{max}}=380$  nm) um 60 nm in den sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums verschoben wird. Weitere 60 Nanometer der bathochromen Verschiebung werden durch den sogenannten Opsin-Shift erbracht [11, 12]. Damit wird ein Absorptionsmaximum erreicht, das je nach Art (im Sinne der biologischen Systematik) [13] bei etwa 500 nm liegt (Abbildung 1.2). Als Opsin-Shift werden dabei die Wechselwirkungen zwi-



**Abbildung 1.2: UV-Vis-Absorptionsspektrum von dunkeladaptiertem und belichtetem Rhodopsin**

Die *schwarze* Kurve mit dem Maximum bei 498 nm im sichtbaren Bereich stellt das Absorptionsspektrum des Rhodopsins dar. Die aktive Spezies Metarhodopsin II, die infolge der Belichtung entsteht, hat das Maximum bei 381 nm (*rote* Kurve)



**Abbildung 1.3: Photoreaktion des Rhodopsins**

Durch die Absorption des Lichts isomerisiert das 11-*cis*-Retinal, bestehend aus einer Polyen-Kette und dem  $\beta$ -Iononring, zur all-*trans* Konfiguration und relaxiert anschließend thermisch durch eine Reihe spektroskopisch wohldefinierter Intermediate zur aktiven Spezies Meta II. Hydrolyse der Schiffchen Base führt zur Entstehung von Opsin und all-*trans*-Retinal. Verändert nach [5]

schen dem konjugierten  $\pi$ -Elektronensystem des Retinals und den umgebenden Aminosäuren (Bindungstasche) mit den daraus resultierenden Verschiebungen des spektralen Bereichs bezeichnet.

Der initiale Schritt der Aktivierung von Rhodopsin (zusammengefasst in Abbildung 1.3) ist die Absorption des Lichts durch den Chromophor 11-*cis*-Retinal [14]. Dies erfolgt mit einer sehr hohen Quantenausbeute von  $\Phi=0,67$  [15], was dazu führt, dass das Retinal zur all-*trans*-Konfiguration isomerisiert. Der Vorgang vollzieht sich innerhalb von ca. 200 fs [16-18], wobei das erste Intermediat Photorhodopsin ( $\lambda_{\max}=570 \text{ nm}$ ) entsteht. Die Intermediate dieser Reaktion sind spektroskopisch über ihre Absorptionsmaxima im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums definiert und stellen energetische Minima bzw. Sattelpunkte in der energetischen Landschaft auf dem Weg zur aktiven Spezies dar. Allerdings lässt sich erst das nächste, dem Photorhodopsin folgende Intermediat Bathorhodopsin (Batho,  $\lambda_{\max}=543 \text{ nm}$ ), welches auf einer Zeitskala von Pikosekunden entsteht, bei 77-80K stabilisieren und spektroskopisch untersuchen [19]. Innerhalb von Nanosekunden bildet sich daraus das sogenannte *blue-shifted-intermediate* (BSI,  $\lambda_{\max}=470 \text{ nm}$ ), das sich nicht stabilisieren lässt und damit einen Sattelpunkt in der energetischen Landschaft darstellt. Das nächste stabilisierbare Intermediat ist dann Lumirhodopsin (Lumi,  $\lambda_{\max}=497 \text{ nm}$ ),

welches auf der gleichen Zeitskala entsteht wie das BSI. Das Lumirhodopsin zerfällt innerhalb von Mikrosekunden in Metarhodopsin I (Meta I,  $\lambda_{\max}=478$  nm), das sich in einem pH- und temperaturabhängigen Gleichgewicht mit der G-Protein-bindenden Spezies Metarhodopsin II (Meta II,  $\lambda_{\max}=382$  nm) befindet [20]. Meta II besteht aus mehreren isospektralen Formen, die über Protonierungsvorgänge und Konformationsänderungen definiert werden [21-23]. Es werden drei Meta II-Spezies unterschieden: Meta II<sub>a</sub>, Meta II<sub>b</sub> und Meta II<sub>b</sub>H<sup>+</sup>. Dabei wird angenommen, dass Meta II<sub>a</sub> strukturell der Meta I-Spezies ähnlich ist, jedoch eine deprotonierte Schiffsbasis aufweist [23, 24]. Beim Übergang von der Meta II<sub>a</sub>- zur Meta II<sub>b</sub>-Spezies erfolgt eine Positionsänderung der Transmembranhelix 6 (TM6) [25]. Schließlich wird an der ionischen Kopplung der Helices 3 und 6 (*ionic lock*, siehe Abschnitt 1.5.5.1) ein Proton aufgenommen, wodurch diese Kopplung zerfällt und die Meta II<sub>b</sub>H<sup>+</sup>-Spezies gebildet wird [26-28].

Mit der Bildung der aktiven Spezies ist der Stimulus, ausgehend von der Bindungstasche und initialisiert durch die *cis-trans*-Isomerisierung des Retinals, an die cytoplasmatische Oberfläche des Rezeptors übertragen. Dies ist der Beginn einer Signalkaskade, die letztendlich ein Aktionspotential hervorruft.

## 1.4 G-Protein-gekoppelte Signaltransduktion

Die strukturelle Beschaffenheit aus sieben transmembranen Helices teilt sich Rhodopsin mit der größten Klasse von Sensoren und ist deren Archetyp [29]. Diese Klasse umfasst z.B. Adreno-, Canabinoid-, Gonadotropin-, Melatonin-, Serotonin- sowie olfaktorische Rezeptoren, um nur einige zu nennen. Es handelt sich dabei um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), die evolutionär hochgradig konserviert sind [30]. Bemerkenswert ist, dass im menschlichen Organismus 80% der Hormone, viele primäre Signalmoleküle, aber auch über die Hälfte der derzeit vorhandenen Pharmaka an GPCR-abhängigen Signaltransduktionswegen angreifen [31]. Der Name GPCR deutet darauf hin, dass die aktive Form des Rezeptors mit einem sogenannten G-Protein interagiert und auf diese Weise ein exogenes Signal an zellinterne biochemische Signalwege übermittelt [32]. Es sind weit über achthundert GPCRs bekannt, die im menschlichen Genom kodiert sind [33], wobei Rhodopsin eine Besonderheit



darstellt, da es als einziges seinen Liganden als kovalent gebundenen inversen Agonisten bereits in der inaktiven Konformation enthält.

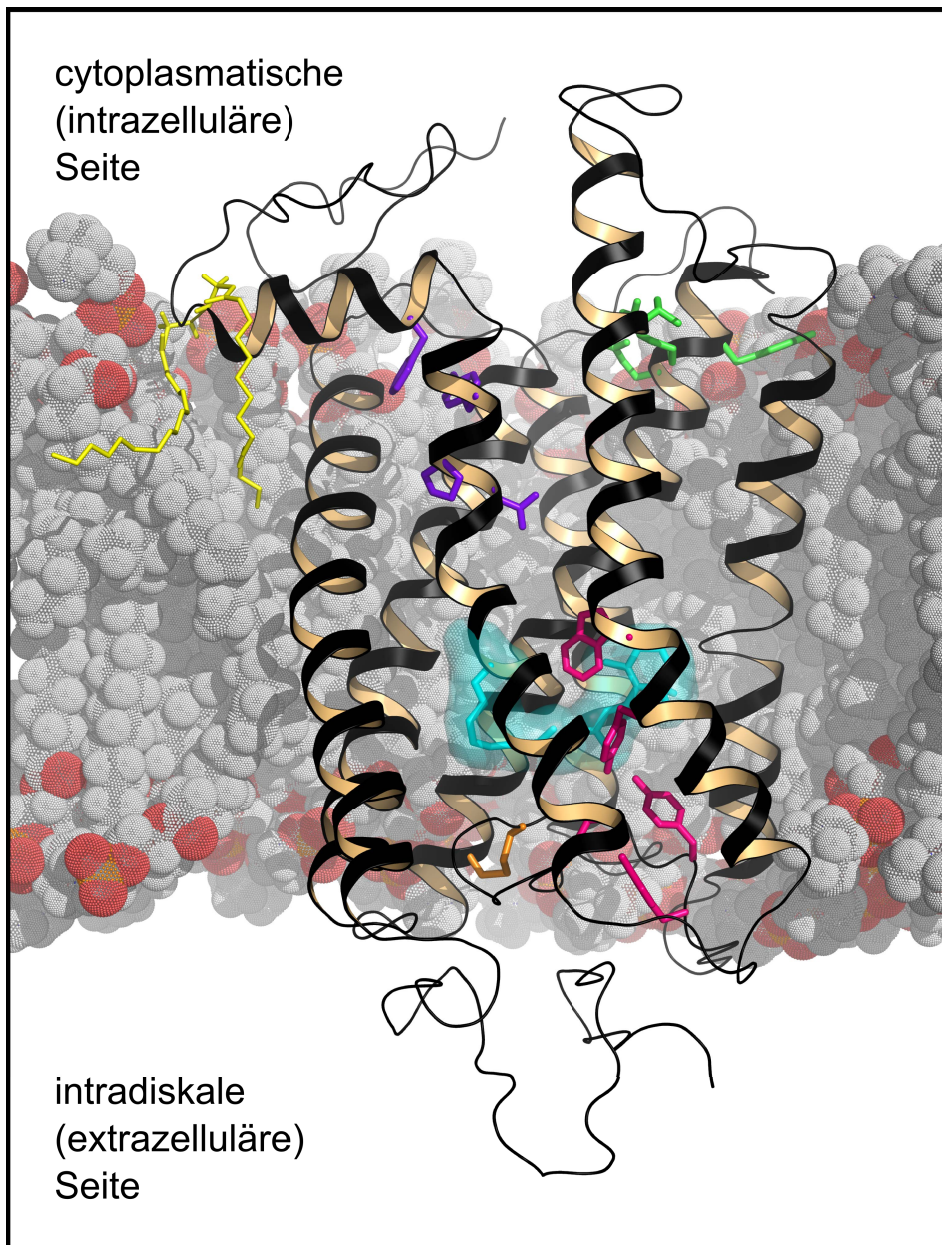
G-Proteine sind, verglichen mit den Rezeptoren, große heterotrimere Proteine, die als Transmitter zwischen den Rezeptoren und *second-messenger*-Systemen fungieren. Daher wird das G-Protein auch Transducin genannt [32]. Die  $\alpha$ -Untereinheit des aus drei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) bestehenden Transducins besitzt nicht nur eine GDP/GTP-Bindungsstelle, sondern ist unter anderem auch für die primäre Bindung [34, 35] an die aktive Konformation des Rezeptors verantwortlich [36]. Sobald ein G-Protein durch einen Rezeptor aktiviert wird, erfolgt ein Austausch von GDP gegen GTP und die davor mit der  $\alpha$ -Untereinheit assoziierten Untereinheiten  $\beta$ ,  $\gamma$  dissoziieren [37].

Diese Interaktion des Rezeptors mit dem G-Protein ist der erste Schritt einer mehrstufigen Signalkaskade mit einer Vielzahl von beteiligten Komponenten, die allgemeingültig unter dem Begriff Signaltransduktion bekannt ist. Ein durch ein Lichtquant aktiviertes Rhodopsin ist in der Lage, mit mehreren G-Proteinen zu wechselwirken [38], die ihrerseits ein weiteres Enzym (Phosphodiesterase PDE) aktivieren. PDE hydrolysiert mehrere cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat) zu GMP mit einer hohen Effizienz [39]. Im dunkeladaptierten Zustand ist cGMP an die Kationenkanäle in der Plasmamembran gebunden und hält diese offen. Das rapide Absenken der cGMP-Konzentration in der Rezeptorzelle wirkt sich auf die cGMP-abhängigen Kanäle aus und unterbindet den Dunkelstrom (Influx von  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Na}^{+}$ -Ionen, Efflux von  $\text{K}^{+}$ -Ionen) an bis zu 500 Kationenkanälen [40]. Dies resultiert in der Hyperpolarisation der Plasmamembran, was letztendlich als ein Aktionspotential an die Synapse der Rezeptorzelle übertragen wird, um dort die Freisetzungsrates des Neurotransmitters Glutamat zu senken. Auf diese Weise wird ein Stimulus über die zellinterne Signaltransduktionskaskade in ein Nervenimpuls übersetzt.

Eine derartig gestaltete Signalkaskade erlaubt eine Amplifikation des ursprünglichen Stimulus und eine direkt damit verbundene Adaptation an unterschiedliche Signalintensitäten.

## 1.5 Funktionelle Bereiche

Die meisten der 348 Aminosäuren des Opsins sind in sieben transmembranen (TM)  $\alpha$ -Helices (TM1-TM7) [41] mit unterschiedlichen Längen und Neigungswinkeln bezüglich der Membranoberfläche organisiert, wobei sich am C-terminalen Ende eine weitere Helix (H8) befindet, die, parallel zur Membranoberfläche, in dieser mit zwei Palmitylresten verankert ist [42, 43]. Die Bewe-



**Abbildung 1.4: Kristallstruktur des Rhodopsins eingebettet in Lipidbilayer**

Übersichtsdarstellung der 7TM-Struktur des bovinen Rhodopsins im Grundzustand (pdb: 1U19 [96]) mit einigen funktionellen Domänen: NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motiv (violett), D(E)RY-Motiv (grün), Palmityl-Verankerung der H8 (gelb), Lys296 mit 11-*cis*-Retinal (hellblau), Disulfidbrücke zwischen Cysteinen 110 und 187 (orange), Interaktionspartner von Glu181 (pink).

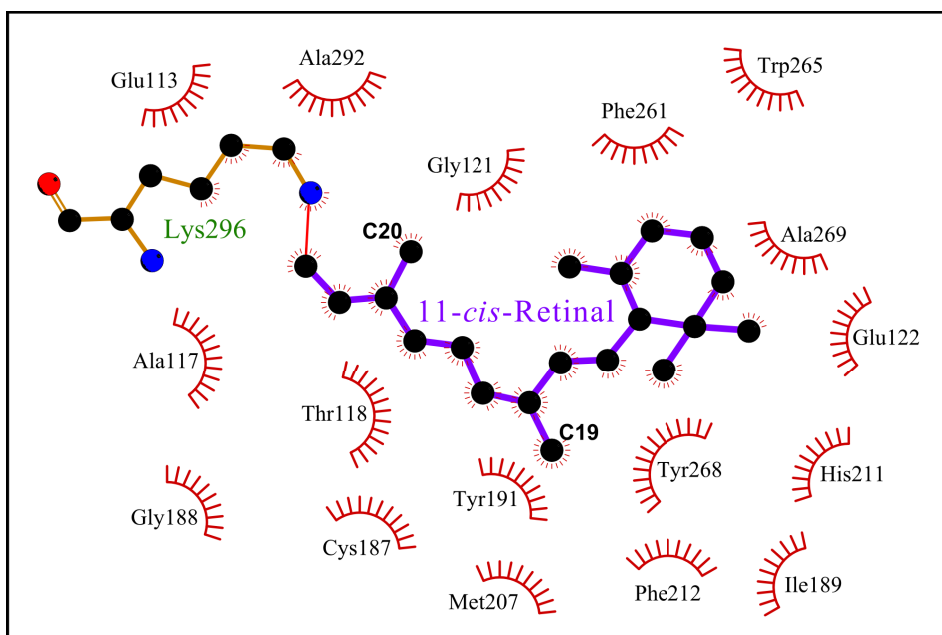
gen der Helices während der Aktivierung werden stets relativ zum Kern (Bereiche des Proteins die nahezu keine Konformationsänderungen bzw. Bewegungen vollführen) beschrieben und dargestellt. Die helikalen Sekundärstrukturelemente werden miteinander durch je drei extra- und intrazelluläre Loops (Schleifen) verbunden.

Das Zusammenhalten (Konsolidierung) dieser Elemente erfolgt durch hydrophobe Kontakte sowie über ein ausgeprägtes Wasserstoffbrückennetzwerk. Bei der Konsolidierung über die hydrophoben Kontakte orientieren sich die apolaren Seitenketten benachbarter Helices unter Wasserausschluss zueinander und stabilisieren dadurch die Integrität des Proteins. Zu diesen apolaren Wechselwirkungen kann auch das als  *$\pi$ -stacking* bekannte Phänomen gezählt werden. Dabei handelt es sich entweder um inter- oder intrahelikale Interaktionen der aromatischen Seitenreste, die der Struktur über Adhäsion der konjugierten  $\pi$ -Elektronensysteme stabilisierende Eigenschaften beisteuern [44] oder um Interaktionen zwischen Kationen und den aromatischen Seitenketten [45]. Man unterscheidet zwei Arten solcher Interaktionen, die auch energetisch voneinander differieren. Die Aromate können eine exzentrische parallele Anordnung der Ringstrukturen (*face-to-face  $\pi$ -stacking*) einnehmen. Diese ist energetisch günstiger als die T-förmige Anordnung, bei der sich die Aromate perpendicular zueinander orientieren (*edge-to-face  $\pi$ -stacking*) [46]. Im Rhodopsin sind beispielsweise Tyr306 und Phe313 aus dem NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motiv (siehe Abschnitt 1.5.5.3) auf parallele Art im Grundzustand aneinander gekoppelt. Es existieren jedoch auch andere Positionen, die im späteren Verlauf näher erläutert werden.

Das in einem Rezeptor vorzufindende, weit ausgedehnte Wasserstoffbrückennetzwerk übt durch ein Zusammenspiel mit geladenen Seitenketten und eingelagerten Wassermolekülen nicht nur eine stabilisierende Funktion aus, sondern übernimmt auch zentrale funktionelle Aufgaben. Ein weiteres, in den Proteinen sehr oft vorkommendes Stabilisierungselement sind Disulfidbrücken, die zwischen zwei benachbarten Cysteinseitenketten ausgebildet werden. Im vorliegenden Fall handelt es sich um die konservierte Anbindung des EL2 (Cys187) an die TM3 (Cys110) auf der extrazellulären Seite des Rezeptors [47, 48]. Im Rhodopsin existieren zahlreiche Domänen bzw. Netzwerke, die zumeist mehrere Aufgaben erfüllen [49] und daher einer besonders detaillierten Darstellung bedürfen.

### 1.5.1 Die Bindungstasche

Die Bindungstasche ist der Interaktionsort des Rezeptors mit einem Liganden. Im Falle von Rhodopsin ist der Ligand als ein inverser Agonist fest mit dem Rezeptor verbunden. Über die gesamte Oberfläche der Bindungstasche sind mehrere Reste verteilt, die nicht nur für die Identifikation des Liganden, sondern auch für die sterische Übertragung der durch die Isomerisierung des Retinals freigegebenen Energie an das Proteingrundgerüst verantwortlich sind (Abbildung 1.5). Zwecks genauerer Analyse wird die Bindungstasche in mehrere Mikrodomänen unterteilt, die als eigenständige Einheiten persistent sind und



**Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Bindungstasche**

11-*cis*-Retinal mit all seinen hydrophoben Interaktionen zu den umliegenden Aminosäuren. Zusätzlich sind die weiteren Schaltelemente des Retinals markiert, die Methylgruppen C19 und C20. *LigPlot*<sup>+</sup>-Darstellung [149] auf der Basis der Rhodopsin-Kristallstruktur (pdb: 1U19 [96])

nachfolgend beschrieben werden. Die Bindungstasche ist zudem Bestandteil des Ligandenkanals. Dabei handelt es sich um zwei Öffnungen der transmembranen Struktur, die in die hydrophobe Schicht des Lipidbilayers münden und als Aufnahme- bzw. Abgabeweg des Liganden diskutiert werden [50, 51].

### 1.5.2 Die Schiffische Base

Die Funktionen der Schiffischen Base (vgl. Abschnitt 1.3) werden nicht nur von Lysin 296 (in der TM7 liegend), das zusammen mit dem Retinal eine Ein-

heit bildet, getragen, sondern gemeinsam mit bestimmten Seitenresten in der unmittelbaren Umgebung [52]. Das Ganze wird als Schiff-Basen-Netzwerk (SB-Netzwerk) bezeichnet. Als erstes ist hier die Glu113 zu erwähnen. Die deprotonierte Seitenkette der Glutaminsäure stellt das Gegenion der Schiff-schen Base dar und stabilisiert diese im Grundzustand [53-56]. Ein weiterer Bestandteil dieses Netzwerkes ist Glu181 [57], deren genaue Funktion immer noch intensiv erforscht wird. Es existieren Evidenzen dafür, dass diese Aminosäure zusammen mit Glu113 ein komplexes Gegenion ausbildet und den Rezeptor in der inaktiven Konformation hält [58] bzw. transient die Rolle des Gegenions übernimmt [59]. In der vorliegenden Arbeit wird unter anderem auf die Rolle dieser Aminosäure im Aktivierungsprozess eingegangen.

### **1.5.3 TM3-TM5-Netzwerk**

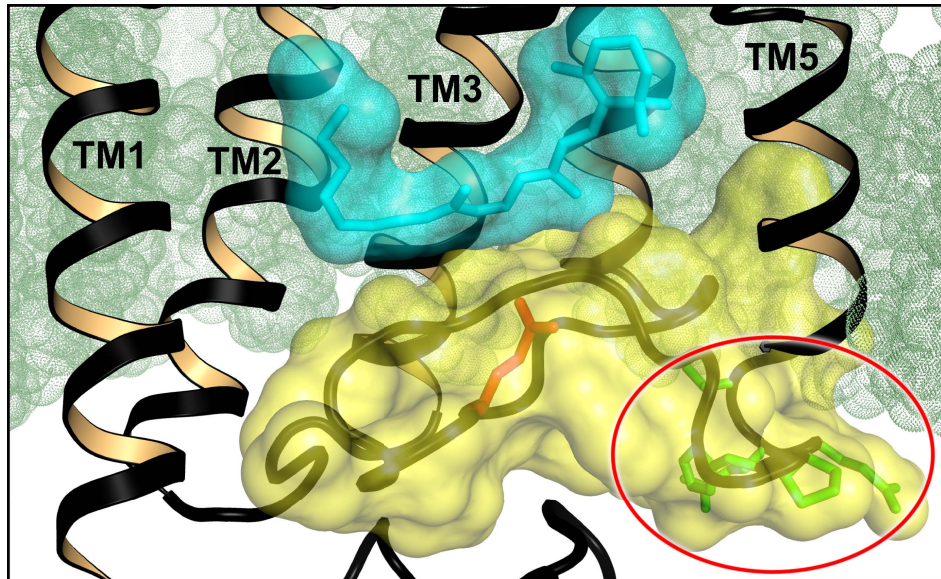
Der Schiff-schen Base gegenüberliegend, auf der Seite des Ringes des Retinals, befindet sich das sogenannte TM3-TM5-Netzwerk, das aus Glu122, His211 [60] sowie Trp126 und Pro215 besteht. Diese Reste, die infolge der Kollision mit dem  $\beta$ -Iononring nach der Isomerisierung ihre relative gegenseitige Orientierung verändern und daraufhin neue Wasserstoffbrücken eingehen [61] [62], sind für die Verankerung der fünften Helix in der inaktiven Konformation zuständig [60]. Die Änderungen in der Beschaffenheit von Wasserstoffbrücken zwischen Glu122 und His211 sind wichtige Monitore in einem FTIR-Spektrum [63-65] (siehe Abschnitt 2.2.3).

Das Retinal besitzt aber noch weitere Schaltelemente, die nach der Isomerisierung bestimmte Strukturänderungen induzieren. Es handelt sich um die Methylgruppen C19 und C20 [66], die ungefähr in der Mitte des Chromophors platziert sind (siehe Abbildung 1.5). Sie sind durch die Aminosäuren Thr118, Ile189, Tyr191, Trp265 und Tyr268 der Bindungstasche in ihrer Bewegungsfreiheit eingeschränkt [67]. Es wird diskutiert, dass diese Teile des Retinals in die Bewegungen von EL2 und TM6 involviert sind bzw. deren Bewegungen erst möglich machen [68, 69].

### 1.5.4 Extrazellulärer Loop 2

Rhodopsin verfügt über eine einzigartige Beschaffenheit des extrazellulären Loops 2. Beim Großteil der GPCRs erstreckt sich dieser Loop in den extrazellulären Raum und fungiert als Erkennungs- bzw. Bindungsstelle für diffusible Liganden [70]. Abbildung 1.6 zeigt einen Ausschnitt des Rhodopsins mit dem farblich hervorgehobenen Loop. Im vorliegenden Fall stellt die Verbindung der Helices 4 und 5 eine Besonderheit dar: Sie faltet sich unter Formierung eines  $\beta$ -Faltblattes in den interhelikalen Raum zurück und bildet eine Art Deckel für die Bindungstasche. Eine derartige Organisation hat zur Folge, dass der Loop über viele Seitenreste mit dem Retinal interagiert, somit einen Teil der Retinalbindungstasche bildet und zwei wichtige funktionelle Mikrodomänen miteinander verbindet. Auf der einen Seite steht er in direktem Kontakt mit dem um die Schiffsche Base angeordneten Wasserstoffbrückennetzwerk bzw. ist ein Teil dieses Netzwerkes, auf der anderen Seite existieren zahlreiche Interaktionen mit dem TM3-TM5-Netzwerk. Die beiden kurzen Stränge des  $\beta$ -Faltblatts werden als  $\beta 3$  und  $\beta 4$  bezeichnet [71]. Die Stränge  $\beta 1$  und  $\beta 2$  gehören zum N-terminalen Ende. Diese Positionierung des EL2, der sich von Trp175 bis Thr198 erstreckt, wird dabei einerseits durch zahlreiche Wasserstoffbrücken zu den umliegenden Helices, andererseits durch eine konservierte Disulfidbrücke [72] zwischen den Aminosäuren Cys110 (TM3) und Cys187 (EL2) stabilisiert. Abgesehen von dieser Brücke ist die Sequenz des EL2 nicht konserviert und hochvariabel in der Klasse der GPCRs. Der Loop besteht aus vielen Aminosäuren, denen eine spezielle Aufgabe bei der Übertragung der Isomerisierungsenergie an das Proteingrundgerüst und folglich auch an die cytoplasmatische Seite des Rezeptors zugesprochen wird. Als erste und wichtigste ist hier das transiente Gegenion der Schiffschen Base, die Glutaminsäure 181, hervorzuheben [57]. Als Zentrum eines wohldefinierten Wasserstoffbrückennetzwerkes mit den Tyrosinseitenketten 192 und 268 bildet sie weitere, wasservermittelte Wasserstoffbrücken zum Serin 186 und zur Glu113, dem Gegenion der protonierten Schiffschen Base im dunkeladaptierten Zustand [73, 74]. NMR-Studien zeigen unter anderem Wechselwirkungen von Gly188 mit einem der Hauptakteure des Aktivierungsmechanismus, dem Tyr268 [75, 76]. Des Weiteren beinhaltet der





**Abbildung 1.6: Der extrazelluläre Loop 2**

Ausschnitt aus der Kristallstruktur des bovinen Rhodopsins im Grundzustand (pdb-id.: 1U19 [96]). Der EL2 (gelbe Oberfläche) als Teil der retinalen Bindungstasche. Die zur T<sub>5</sub>E<sub>2</sub>C-Region (rot umkreist) gehörenden Aminosäuren sind grün dargestellt. Das transiente Gegenion der Schiffischen Base, Glu181 (orange) ist nahezu zentral positioniert. 11-*cis*-Retinal ist kovalent an das Lys296 gebunden (hellblaue Oberfläche)

EL2 Tyr191, das bislang wenig untersucht wurde, dessen Rolle unter anderem jedoch Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist (siehe Abschnitt 1.5.8.1).

Zusätzlich soll in der vorliegenden Arbeit auch die Übergangsregion in die fünfte Transmembranhelix genauer analysiert werden, da zur Vermutung steht, dass auch dieser Region wegen der artenspezifischen Variabilität (ausführlich im Abschnitt 1.6.1) eine wichtige Rolle im Mechanismus der Schaltungsvorgänge bei der Entstehung der aktiven Spezies zukommt. Diese Region wird vom Autor als T<sub>5</sub>E<sub>2</sub>C-Region (*engl.* TM5-EL2-Connection) bezeichnet und ist ebenfalls in Abbildung 1.6 gesondert dargestellt.

### 1.5.5 Cytoplasmatische Seite

Auf der endoplasmatischen Seite des Rezeptors sind mindesten drei weitere Mikrodomänen vorhanden, von denen zwei besonders hervorzuheben sind, nämlich die hochkonservierten Motive NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F und D(E)RY, die einerseits zur Konsolidierung der 7TM-Struktur beitragen, andererseits Konformationsänderungen während der Aktivierung erfahren [77].

#### 1.5.5.1 D(E)RY-Motiv

Die namensgebenden Aminosäuren des D(E)RY-Motivs sind Glu134, Arg135 und Tyr136 am cytoplasmatischen Ende der TM3 [78]. Eine funktionelle Schlüsselrolle kommt dem Arginin 135 zu. Die unter physiologischen Bedingungen protonierte Guanidiniumgruppe des Arginins erfüllt nicht nur im Rhodopsin, sondern in der gesamten Klasse A der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gleich mehrere Aufgaben. In der dunkeladaptierten Konformation des Rezeptors werden mehrere Wasserstoffbrücken zu den umgebenden Aminosäuren Glu134, Glu247 und Thr251 ausgebildet [79, 80], wobei die dritte mit der sechsten Helix verbunden und die Ladung des Arginins abgeschirmt/neutralisiert wird. Dieses Netzwerk um das Arginin wird als *ionic lock* bezeichnet [28]. Auf dem Weg zur aktiven Konformation des Rezeptors wird durch dieses Netzwerk ein Proton aufgenommen [26, 27], wobei die stabilisierende Verbindung zwischen den Helices zerfällt und die Seitenkette des Arginins zur Andockstelle für das G-Protein wird.

#### 1.5.5.2 Y(x)<sub>7</sub>K(R)-Motiv (Y223)

Neben dem D(E)RY-Motiv liegt die in der TM5 lokalisierte Mikrodomäne Y(x)<sub>7</sub>K(R). Diese besteht hauptsächlich aus zwei Seitenketten, dem Tyr223 und dem Lys231 [81], die den aktiven Zustand des Rezeptors stabilisieren. Diese Erkenntnis konnte erst aus den Kristallstrukturen des aktiven Zustandes abgeleitet [82] und experimentell gezeigt werden [77]. Die präzise Funktion der Tyrosinseitenkette 223, also ihr Einfluss auf das Meta I / Meta II-Gleichgewicht wurde in der dieser Dissertation zugrundeliegenden Publikation ausführlich beschrieben und dargestellt [7]. Mithilfe der ortsspezifischen Mutagenese wurden drei Mutanten des Tyrosins 223 hergestellt (Y223A/F/E) und spektroskopisch analysiert. Dabei wurde gezeigt, dass die Hydroxylgruppe des Phenolrings in die stabilisierenden Interaktionen mit dem Arg135 involviert ist und dadurch die Protonenaufnahme am D(E)RY-Motiv bei der Entstehung der aktiven Spezies erleichtert. Des Weiteren ist der hydrophobe Ring der Seitenkette für eine effiziente Aktivierung des Transducins notwendig [7]. Dennoch wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit eine weiterführende, auf dieser Veröffentlichung basierende Studie vorgestellt.



### 1.5.5.3 NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motiv

Das NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motiv befindet sich räumlich gesehen unweit vom D(E)RY-Motiv und ist in der inaktiven Konformation für die Kopplung der Helices TM7 und H8 zuständig [83]. Dies beinhaltet auch die als  *$\pi$ -stacking* bekannte elektrostatische Interaktion zwischen den aromatischen Seitenketten der Aminosäuren Tyr306 und Phe313. Die vorhandenen Kristallstrukturen offenbaren, dass diese Mikrodomäne über zahlreiche Wasserstoffbrücken und Wassermoleküle auch mit der Schiffchen Base in Verbindung steht [84, 85]. Hierbei scheint Asn302 von großer Wichtigkeit sowohl für die Aufrechterhaltung der stabilen Grundzustandsstruktur als auch während der Aktivierungskaskade des Rezeptors zu sein. So soll das Asn302 mit Asn55, Trp265 und Asp83 kontaktieren, wobei es sich bei diesen um bekannte und konservierte Schlüsselpositionen im Rhodopsin handelt [62].

Die genaue Arbeitsweise dieser Region ist aktuell Gegenstand vieler Forschungsarbeiten, bekannt ist jedoch, dass das Tyr306 während des Aktivierungsprozesses seine Grundzustandsposition verlässt, sich zum D(E)RY-Motiv orientiert und beim Protonieren des *ionic locks* assistiert bzw. die aktive Konformation stabilisiert.

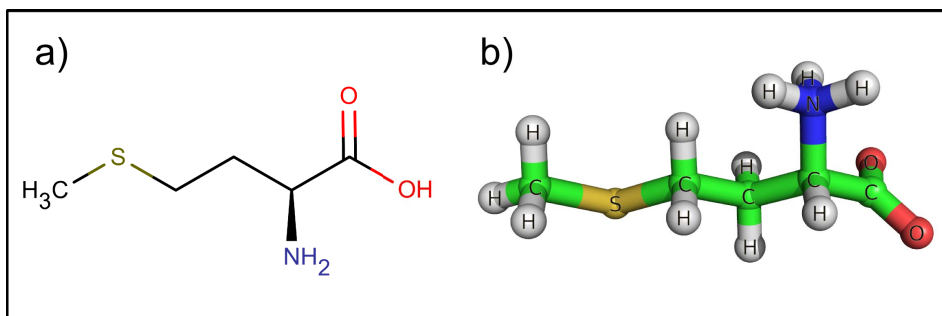
### 1.5.6 Wasser

Den konservierten Motiven und funktionellen Aminosäuren in einem Protein sind auch inkorporierte Wassermoleküle gleichzusetzen. Eine Vielzahl von konservierten und fest positionierten Wassermolekülen übernimmt ähnliche Aufgaben, die sonst den Aminosäuren zugeschrieben werden. Damit sind sie unerlässlich für Vorgänge wie die Reorganisation von Wasserstoffbrückennetzwerken als Ursache bzw. treibende Kraft für Bewegungen der Sekundärstrukturelemente und Konformationsänderungen [86, 87]. So erfolgt beispielsweise beim Übergang zum letzten inaktiven Zustand Meta I eine drastische Zunahme der internen Hydratisierung des Rezeptors [88], während der Meta I → Meta II-Übergang von einer temperaturabhängigen Wasserabgabe begleitet wird [89]. In der Bindungstasche vermitteln Wassermoleküle die Protonentransfervorgänge [90] und fungieren als regulatorische Schalter und Abstandshalter zwischen der Schiffchen Base und dem transienten Gegenion Glu181 [91].

Die hochaufgelösten Kristallstrukturen (1,8 Å) der Adenosin- und  $\delta$ -Opioid-Rezeptoren, ebenfalls Klasse-A-GPCRs, denen neben dem Rhodopsin eine bedeutsame Rolle in der grundlagenbasierten Erforschung der G-Protein-geschalteten Signaltransduktion zukommt, zeigen ein ausgedehntes Wasser-Netzwerk im Proteininneren [92, 93]. Diese Strukturen können als Ausgangspunkt für molekular-dynamische Simulationen (MD-Simulationen) verwendet werden, die die Schlussfolgerungen zulassen, dass zum einen im Rhodopsin eine ausgedehnte Wassertasche existiert, die zwischen der Schiffschen Base und dem NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motiv positioniert ist und zum anderen während der Aktivierung Wasser aus der Umgebung aufgenommen wird [94].

### 1.5.7 Methionin-Cluster

Methionin ist eine schwefelhaltige, proteinogene, essentielle Aminosäure, wobei das Schwefelatom über die Thioetherverbindung in die Kohlenstoffkette inkorporiert ist (Abbildung 1.7). Die eukaryotische Proteinbiosynthese fängt grundsätzlich mit Methionin an, wobei während der posttranslationalen Modifikation der Proteine dieses Methionin am N-terminalen Ende häufig abgetrennt oder (z.B. durch Acetylierung) abgeändert wird [95].

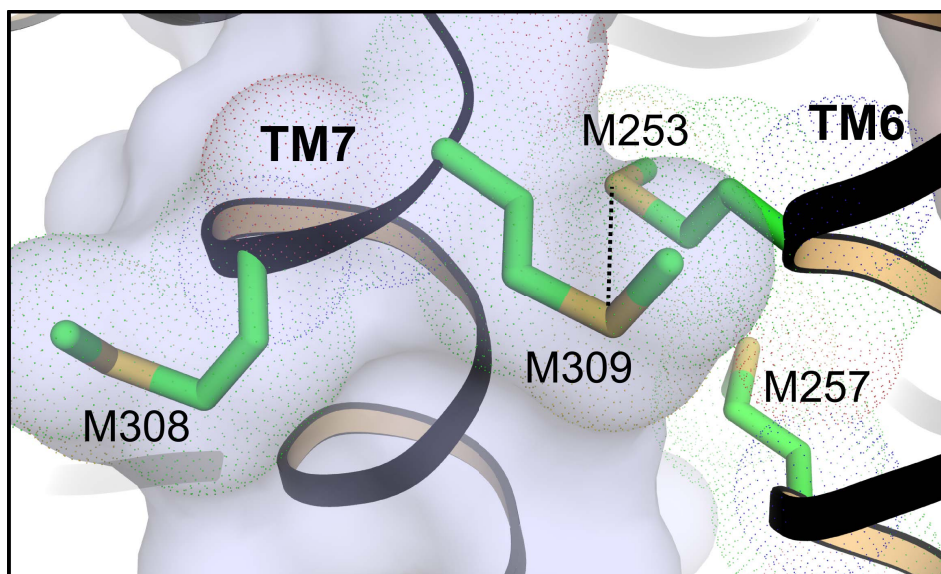


**Abbildung 1.7: Proteinogenes L-Methionin**

**a)** Strukturformel von L-Methionin **b)** 3D-Darstellung von L-Methionin unter physiologischen Bedingungen: Die Carboxylgruppe ist deprotoniert, die Aminogruppe hingegen protoniert.

Die Kristallstruktur des dunkeladaptierten Rhodopsins offenbart, dass sich zwischen den hochkonservierten Motiven D(E)RY und NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F eine markante Anhäufung von vier Methioninseitenketten befindet [96]. Einerseits liegen diese, jeweils paarweise, in unterschiedlichen Helices, andererseits aber scheinen drei von diesen Resten miteinander zu interagieren (Abbildung 1.8). Zwei dieser Reste, nämlich 253 und 257, sind ein Bestandteil der sechsten Transmembranhelix, von der bekannt ist, dass sie eine zentrale Rolle im Aktivie-

rungsprozess spielt [97, 98]. Im Zusammenspiel mit zahlreichen Leucinseitenketten formen diese beiden Methionine eine sogenannte hydrophobe Barriere, die die cytoplasmatische Oberfläche vom SB-Netzwerk separiert [99]. Außerdem ist Met253 ein Teil der G-Protein-Bindungstasche [85] und wurde bei Studien zum Anbringen eines Markers benutzt, der die Bewegungen der TM6 im Aktivierungsprozess visualisieren soll [25, 100]. Die Methionine 308 und 309 sind hingegen in der Übergangsregion von der TM7 in die Helix 8 situiert und können dementsprechend zum NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motiv gezählt werden. Diese Ansammlung, im weiteren Verlauf als Methionin-Cluster bezeichnet, fand bislang nur wenig Beachtung, es wurden jedoch bereits einzelne Methionine aus diesem Cluster hinsichtlich ihrer Funktionalität untersucht, wobei von Han et. al. auf die wichtigen und spezifischen Wechselwirkungen von Met257 mit dem NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motiv hingewiesen wurde [101]. Die mechanistischen Ursachen dieser Interaktionen sollen in diesem Kapitel beschrieben und postuliert werden. Außerdem ist bekannt, dass die Mehrzahl der Substitutionen des Met257 durch andere Aminosäuren konstitutiv aktives Opsin hervorbringt [101]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Met257 im aktiven Zustand des Rezeptors molekulare Kontakte mit Tyr306 aus dem NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motiv und dem Tyr223 aus dem Y(x)<sub>7</sub>K(R)-Motiv ausbildet [77]. Aus der obigen Abbildung wird



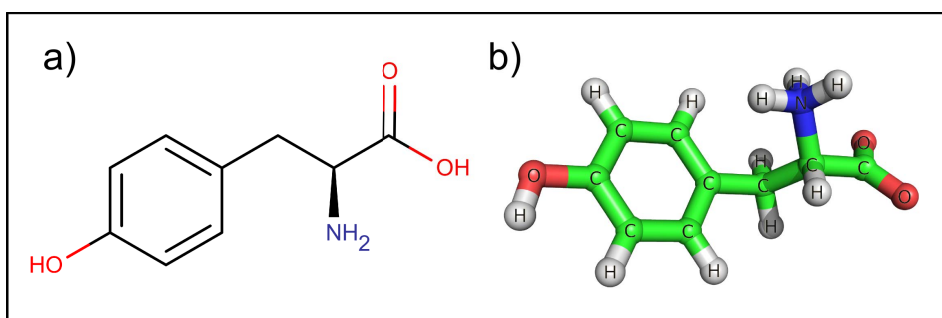
**Abbildung 1.8: Methionin-Cluster**

Anordnung der Methionine M353 und M257 aus der sechsten Transmembranhelix (TM6) und der Methionine 308 und 309 aus dem NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motiv (hellblaue Oberfläche) in der Grundzustandsstruktur des Rhodopsins (pdb-id: 1U19 [96]). Zwischen den Schwefelatomen der Methionine 253 und 309 kann ein Abstand von 5 Å (visualisiert durch gestrichelte Linie) ermittelt werden.

ersichtlich, dass das Methionin 308 eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint: Es ist zur Bilayeroberfläche orientiert und nimmt daher nicht an der Clusterbildung teil. Ganz anders verhalten sich die Methionine 253, 257 und 309. Die Abstände zwischen den Schwefelatomen, die sich aus der Kristallstruktur des Grundzustandes (pdb-id: 1U19 [96]) berechnen lassen, suggerieren, dass diese drei Seitenketten nicht nur miteinander interagieren, sondern auch eine funktionelle Einheit ausbilden. Dabei liegt eine Art Verzahnung zwischen der TM6 und dem NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motiv vor, die durch die Methioninseitenketten realisiert wird. Dies wird durch die Kristallstruktur des aktiven Zustands (pdb-id: 3PXO [82]), in dem sich die Abstände und Orientierungen der Seitenketten drastisch verändern, nochmals bekräftigt. So werden beispielsweise im Grundzustand 5 Å zwischen den Methioninen 253 und 309 ermittelt, im Gegensatz zu lediglich 3,5 Å in der aktiven Konformation.

### 1.5.8 Tyrosine

Tyrosin ist eine hydrophobe, aromatische, proteinogene Aminosäure (Abbildung 1.9) und ein elementarer Bestandteil vieler Proteine, die bei den Mammalia durch die Hydroxylierung der essentiellen Aminosäure Phenylalanin hergestellt wird [95]. Zusammen mit Phenylalanin und Tryptophan ist Tyrosin für die UV-Vis-Absorption bei 280 nm, die sogenannte Protein-Bande, verantwortlich. Ganz spezielle Bedeutung hat Tyrosin in bestimmten Signaltransduktionsprozessen, da es sich durch die Phosphorylierung mittels Proteinkinasen auf die Aktivität der Effektoren auswirkt. In der visuellen Signaltransduktion erfolgt die Deaktivierung des Rhodopsins jedoch durch die Phosphorylierung der Serin- und Threoninseitenketten mittels Rhodopsinkinase.



**Abbildung 1.9: Proteinogenes L-Tyrosin**

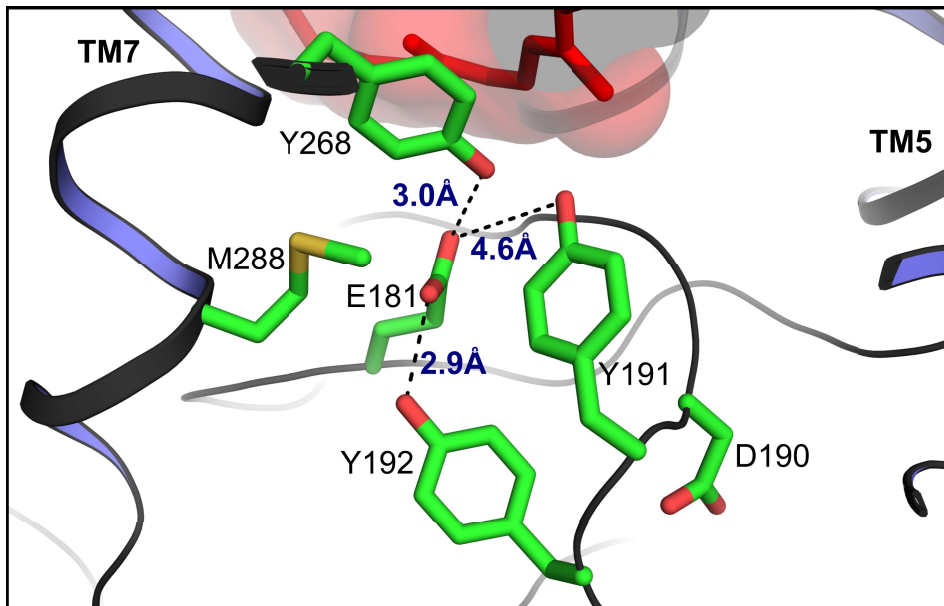
**a)** Strukturformel von L-Tyrosin **b)** 3D-Darstellung von L-Tyrosin unter physiologischen Bedingungen: Carboxylgruppe ist deprotoniert, Aminogruppe hingegen protoniert.

Rhodopsin enthält 18 Tyrosine [71]. Mindestens drei davon sind bereits dank zahlreicher Untersuchungen in ihrer Rolle für die Aktivierungskaskade ausgiebig beschrieben worden [81]. Es handelt sich um Bestandteile von drei der bedeutendsten hochkonservierten Motive an der cytoplasmatischen Seite des Rezeptors: Tyr136 aus dem D(E)RY-Motiv, Tyr223 aus dem Y(x)<sub>7</sub>K(R)-Motiv und Tyr306 aus dem NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motiv [7, 77, 83]. Alle drei Motive interagieren miteinander im Laufe der Rezeptoraktivierung und sorgen nicht nur für die Aufrechterhaltung der inaktiven, sondern auch für die Bildung der aktiven Konformation [77].

#### 1.5.8.1 Tyrosine 191 und 192 aus dem EL2

Abgesehen von diesen drei Tyrosinen aus den hochkonservierten Motiven besitzt Rhodopsin 15 weitere Tyrosinseitenketten, von denen sich ein Großteil auf der intradiskalen Seite des Rezeptors befindet. In dieser Arbeit wird die Funktion von drei dieser Tyrosinseitenketten mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie analysiert und es werden weitere Aspekte der biophysikalischen Bedeutung der Tyrosine herausgearbeitet. Im besonderen Fokus liegen hierbei die Tyrosine 191 und 192 aus dem EL2, denen Interaktionen mit dem transienten Gegenion der Schiffschen Base Glu181 nahegelegt werden [102] sowie das Tyrosin 206 aus der TM5, das höchstwahrscheinlich mit dem TM3-TM5-Netzwerk interagiert.

Das Tyrosin an Position 191 ist bereits Gegenstand einiger weniger Untersuchungen gewesen, die jedoch abhängig von der verwendeten Methode zu teilweise widersprüchlichen Ergebnissen gekommen sind. So wurde beispielsweise berichtet, dass die Mutanten des Tyrosins 191 die Bildung der aktiven Spezies Meta II mit der gleichen Effizienz wie der Wildtyp vollführen [103]. Auffällig war jedoch, dass die signifikante Fraktion dieser Mutanten mit dem kovalent gebundenen Chromophor nach der Belichtung zusammengeblieben ist und eine Meta III-artige Spezies bildete [103] (Meta III ist eine der Zerfallsformen der aktiven Spezies [104, 105]). Dies lag an den verwendeten Mutationen [106], sicherlich aber auch daran, dass die Proteine in der solubilisierten Form und nicht als in die Vesikel rekonstituierte Proben gemessen worden sind, denn Detergenzien wirken sich sehr stark auf die Gleichgewichtslage von Meta I und Meta II aus [107]. Eine weitere Studie, die sich mit der Beschaffenheit des EL2



**Abbildung 1.10: Glutaminsäure 181 im Grundzustand**

Wasserstoffbrückenbindungen von Glu181 mit Tyr192 (2,9 Å) und Tyr268 (3,0 Å) im dunkeladaptierten Zustand (pdb-id: 1U19 [96]). Tyr191 ist hingegen für eine Wasserstoffbrücke viel zu weit von Glu181 entfernt (4,6 Å). 11-*cis*-Retinal ist im oberen Bildbereich *rot* dargestellt.

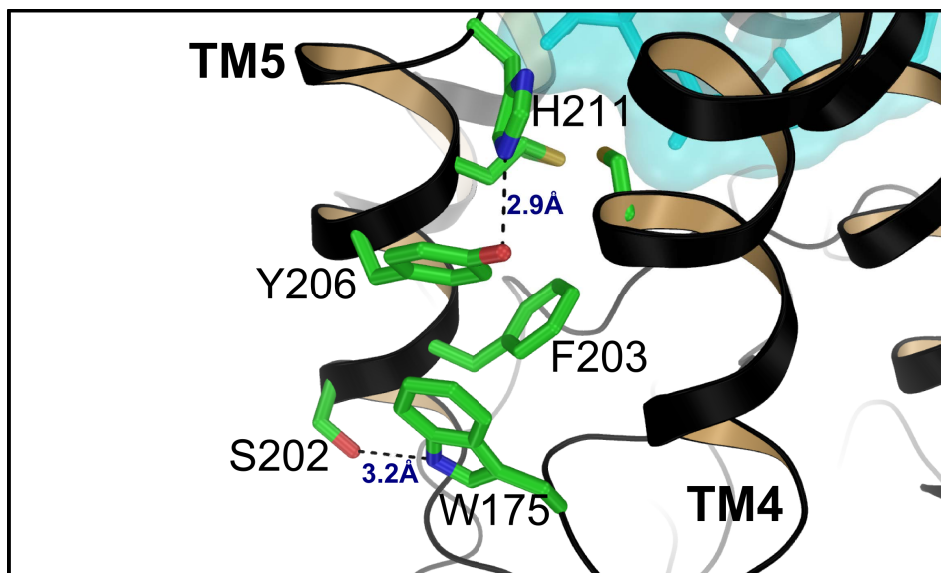
beschäftigt, zeigte, diesmal anhand der Y191F-Mutante, dass die Entstehung von Meta II langsamer verläuft als im Wildtyp und suggerierte daher eine wichtige Rolle dieser Seitenkette während der Photoaktivierung des Rhodopsins [108]. In anderen Studien und mit anderen Methoden, wie der NMR oder der zeitaufgelösten Resonanz-Raman-Spektroskopie, wurde zudem auf die Wichtigkeit dieses Restes hingewiesen, ohne dass jedoch Einflüsse dieses Tyrosins direkt bestimmt worden sind [109] oder es wurden ebenfalls solubilisierete und damit wenig aussagekräftige Proben verwendet [75].

Die Position 192 wurde teilweise in denselben Studien untersucht wie die 191 [75, 106, 108, 109]. Die direkte Interaktion des Tyrosins 192 mit dem transienten Gegenion der Schiffsbasis (Glu181) im Grundzustand und dadurch auch mit dem gesamten Wasserstoffbrückennetzwerk um die Schiffsbasis [71] machte diese Seitenkette zu einem deutlich interessanteren Untersuchungsobjekt. So wurde beispielsweise festgestellt, dass die Y192F-Mutante nicht nur verschobene Absorptionsmaxima im Grundzustand ( $\lambda_{\text{max}}=491 \text{ nm}$ ) wie auch im Meta II-Zustand ( $\lambda_{\text{max}}=386 \text{ nm}$ ) aufweist, sondern auch den Zerfall der aktiven Spezies beschleunigt und lediglich 19% der normalen  $G_i$ -Aktivierungsrate zeigt [110]. Da die Glutaminsäure 181 die Absorptionswellenlängen modu-

liert [111], können die beobachteten Verschiebungen im Falle der Y192F-Mutante durch die fehlende Wasserstoffbrücke zum Glu181 verursacht werden.

#### 1.5.8.2 Tyrosin 206 aus der TM5

Aus Abbildung 1.11 wird ersichtlich, dass das Tyrosin 206 zwischen zwei weiteren aromatischen Seitenketten eingespannt ist. Derartige Orientierungen der Aromaten zueinander bedeuten, dass die konjugierten  $\pi$ -Elektronensysteme der Ringe stabilisierende Interaktionen miteinander eingehen können. Die Kristallstruktur des inaktiven Rhodopsins suggeriert hierbei eine nahezu parallele Anordnung von Tyr206 und Trp175 sowie eine perpendicular zueinander stehende Orientierung von Tyr206 und Phe203. Trp175 ist seinerseits zu 98% in der Rhodopsin-Subfamilie der Klasse-A-GPCRs konserviert [62] und stabilisiert möglicherweise die Opsinstruktur während der Proteinfaltung [112]. Die beiden Interaktionspartner des Tyr206 sind ihrerseits ebenfalls senkrecht zueinander angeordnet. Diese stabilisierenden Wechselwirkungen, lassen vermuten, dass diese Mikrodomäne und Tyrosin 206 an der Kopplung der Bewegungen von EL2 und TM5 beteiligt sind, was vor allem unter Berücksichtigung der Tatsachen bestärkt wird, dass zwei der drei Aromaten Bestandteile der fünften Helix sind, also des Sekundärstrukturelementes, welches im Laufe des Aktivierungsprozesses die meisten Bewegungen vollführt, und, dass Positionsänderungen



**Abbildung 1.11: Detaillierte Darstellung des Bereiches um das Tyr206**

Die mutmaßlichen  $\pi$ -stacking-Interaktionspartner des Tyr206, die Aminosäuren Trp175, Phe203 und His211. Ein weiteres Kopplungselement des EL2 an die TM5 ist möglicherweise die Brücke zwischen Trp175 und Ser202. Aus der Kristallstruktur des Rhodopsins (pdb-id: 1U19 [96])



von Tryptophanseitenketten gerade im Rhodopsin dafür bekannt sind, Bewegungen der Sekundärstrukturelemente induzieren zu können (*toggle-switch* von Trp265 und die darauffolgende Rotation der TM6 [69, 113, 114]). Diese Annahme wird zudem untermauert, wenn außerdem noch andere Interaktionen dieser Aromaten betrachtet werden, was im Laufe der vorliegenden Arbeit zu beweisen galt. So befindet sich Trp175 nur 3,2 Å vom Ser202 entfernt, was ein ausreichender Abstand für die Bildung einer Wasserstoffbrücke ist. Die Hydroxylgruppe des Tyr206 ist noch näher am His211. Der hier gemessene Abstand von 2,9 Å bedeutet, dass dieses Tyrosin in der Lage ist, direkt mit dem TM3-TM5-Netzwerk interagieren zu können. Tatsächlich fungiert Tyr206 bei NMR-Studien mit seinen chemischen Verschiebungen als eine Art Sonde für das TM3-TM5-Netzwerk [76].

## 1.6 Humanes Rhodopsin

Der Aktivierungsmechanismus des Rhodopsins wurde in der Vergangenheit in umfangreichen Studien anhand des zur Verfügung stehenden bovinen Rhodopsins untersucht. Um eine bessere Relevanz der Ergebnisse für medizinische Zwecke zu erzielen, ist es jedoch notwendig, auch die humanen Rezeptoren spektroskopisch genauer zu charakterisieren. Es gab bereits einige Publikationen über den humanen Wildtyp und dessen Vergleiche mit dem Lichtrezeptor aus dem Rinderauge [115-118]. Im Rahmen der damals verfügbaren Techniken und Methoden ließen sich jedoch nur wenige Unterschiede feststellen und ihre molekularen Ursachen untersuchen. Das hatte schließlich zur Konsequenz, dass sämtliche Forschungsarbeiten am deutlich einfacher zugänglichen bovinen Rhodopsin durchgeführt worden sind. Moderne Methoden der artifiziellen Proteinsynthese erlauben aber, dass nahezu jedes Protein in ausreichender Menge für wissenschaftliche Analysen hergestellt werden kann. Die sequenzielle Abfolge, einer Datenbank entnommen, kann dabei über bestehende Expressionssysteme, aber auch zellfrei (*cell-free expression* [119]) hergestellt werden. Ein Vergleich von menschlichem und bovinem Rhodopsin (Abbildung 1.12) offenbart, dass sich die beiden Proteine in ihrer Sequenz an 23 Stellen unterscheiden [120]. In das vorliegende Plasmid für den bovinen Wildtyp müssen demnach an 23 Positionen Mutationen eingeführt werden, um

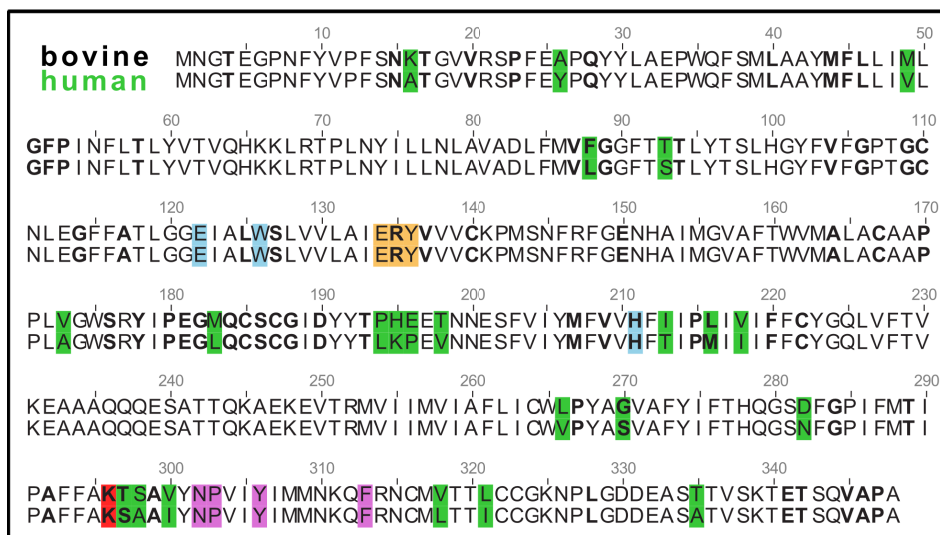


den humanen Wildtyp zu erhalten. Das auf diese Weise erhaltene Protein mit der humanen Sequenz kann genauso wie sein bovines Analogon aufgereinigt und in eine künstliche Lipidumgebung eingelagert werden, wie dies auch im Laufe der vorliegenden Arbeit geschehen ist.

Die diesem Vorgehen zugrunde liegende Motivation reicht dabei von der Erweiterung des Grundlagenwissens über den Aktivierungsmechanismus des Rezeptors anhand der natürlich vorhandenen Variabilität bis hin zu einem insgesamt besseren Verständnis der mit dem Rezeptor direkt verbundenen Krankheiten, wie *Retinitis pigmentosa* (siehe Abschnitt 1.6.2).

Bestehende Arbeiten zum menschlichen Rhodopsin legten zunächst die Vermutung nahe, dass die beiden Rezeptoren sich nicht unterscheiden würden, insbesondere auch, da alle sequentiellen Abweichungen weit von den hochkonservierten funktionellen Domänen entfernt liegen.

Dagegen sprach aber die bereits bekannte Tatsache, dass die Absorptionsmaxima der Dunkelzustände von bovinem und humanem Rhodopsin sich um 4 nm unterscheiden [117]. Bereits die ersten IR-spektroskopischen Messungen im Rahmen dieser Arbeit konnten Unterschiede in der Funktionsweise der beiden Proteine zeigen, sodass für eine eingehendere Untersuchung, über Kooperationen, weitere dem Institut zur Verfügung stehende Methoden für die systematische Analyse dieser Ursachen herangezogen wurden. In Ergänzung zu den



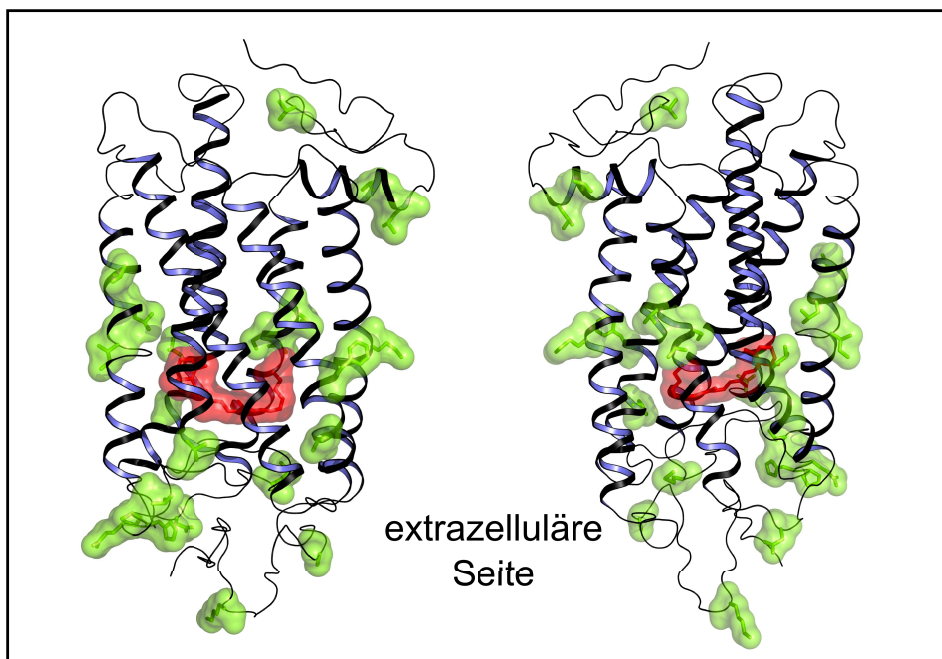
**Abbildung 1.12: Alinierung der Aminosäuresequenzen vom humanen und bovinen Rhodopsin**

Die 23 Positionen, an denen sich die beiden Sequenzen voneinander unterscheiden, sind grün hinterlegt. Ebenfalls farblich hervorgehoben sind drei hochkonservierte Motive: D(E)RY (orange), NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F (violett) und TM3-TM5-Netzwerk (hellblau). Das Lysin 296 der Schiffchen Base ist in rot markiert.

spektroskopischen Techniken erwiesen sich dabei die in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewinnenden theoretischen Berechnungen (MD-Simulationen) als ein hilfreiches Werkzeug zur Dateninterpretation.

### 1.6.1 Sequenzieller Vergleich

Wie bereits erwähnt, stellt Rhodopsin den Archetyp der Klasse A der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren dar. Daher ist es keine Überraschung, dass die hochkonservierten Domänen bei beiden Rezeptoren identisch sind [120]. Viel interessanter sind jedoch die verschiedenen Bereiche, die außerhalb dieser Domänen vorzufinden sind sowie deren möglicher Einfluss auf den Aktivierungsmechanismus. Von den 23 abweichenden Positionen gibt es sicherlich viele, die nur einen marginalen Einfluss auf die Entstehung der aktiven Spezies haben. Das sind Aminosäuren, die gleichartige physikochemische Eigenschaften aufweisen, wie eine ähnliche Größe der Seitenkette und/oder gleiche Ladungen (z.B. F88L, T93S, V173A, L266V, L321I). Bemerkenswert ist außerdem, dass der Großteil der Unterschiede auf der extrazellulären Seite des Rezeptors lokalisiert ist (Abbildung 1.13), also in jenen Regionen, die den Stimulus an die G-Protein-bindende Domäne übertragen. Diese ist wiederum

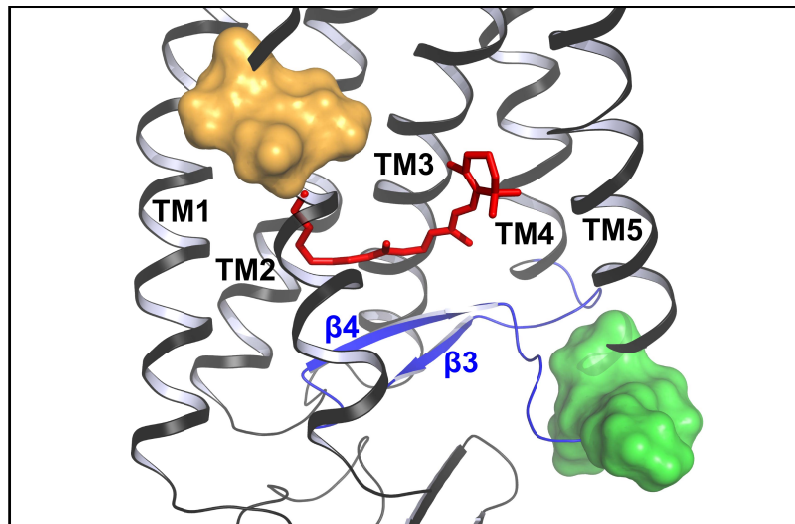


**Abbildung 1.13: 23 Unterschiede zwischen humanem und bovinem Rhodopsin**

Homologiemodell des humanen Rhodopsins, basierend auf der bovinen Kristallstruktur (pdb: 1U19 [96]). Zur besseren Übersicht spiegelbildlich dargestellt. Die 23 Positionen sind grün markiert. K296 mit 11-*cis*-Retinal sind rot.

nahezu unbeeinflusst und hat die gleiche Beschaffenheit wie die des bovinen Rhodopsins.

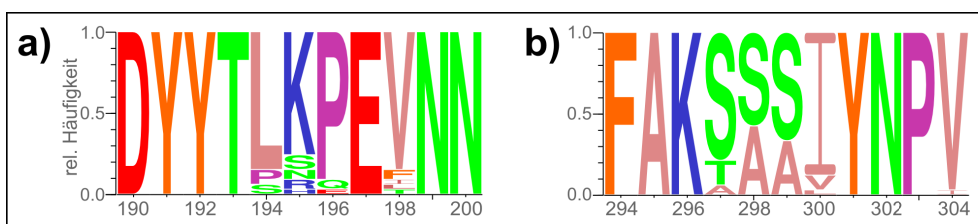
Eine Gegenüberstellung aller vorhandenen Säugetier-Rhodopsine zeigt zwei auffällige Bereiche mit einer besonders hohen Variabilität (siehe Anhang, Abbildung 6.1 vgl. Abbildung 4.4). Der erste Bereich ( $T_5E_2C$ -Region, Aminosäuren 194-198; Abbildung 1.14 grüne Oberfläche; Abbildung 1.15a), deren Beschaffenheit u.a. durch die Positionierung des Helixbrechers Prolin definiert wird, betrifft den Übergang der TM5 zum extrazellulären Loop 2. Es ist bekannt, dass infolge der Isomerisierung der  $\beta$ -Iononring des Retinals mit dem stabilisierenden Wasserstoffbrückennetzwerk der TM3 und TM5 kollidiert [121], dieses zerstört und somit das Ausklappen der fünften Helix induziert. Auf diese Weise wird der Stimulus über das Proteingrundgerüst an die cytoplasmatische Seite übertragen. Die Bewegungen der fünften Helix und des EL2 sind aber über das  $T_5E_2C$  gekoppelt, sodass die sequenzielle Beschaffenheit des  $T_5E_2C$  maßgeblich für die Elastizität dieser Kopplung ist. Der humane Rezeptor trägt dabei die  $T_5E_2C$ -Abfolge LKPEV, die bei Mammalia üblich ist, während das bovine Rhodopsin mit PHEET ein Unikum zu sein scheint (Abbildung 1.15a).



**Abbildung 1.14: Sequenzbereiche größter Diskrepanz**

Zwei Bereiche größter Variabilität aus der Sequenzalinierung vom humanen und bovinen Rhodopsin. Der Bereich zwischen der Schiffsbasis und dem NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motiv ist als *orange* Oberfläche dargestellt. Der Übergang zwischen dem EL2 und TM5 ( $T_5E_2C$ -Region) als *grüne* Oberfläche. Der EL2 mit den  $\beta$ -Faltblattsträngen  $\beta_3$  und  $\beta_4$  ist *blau* hervorgehoben. Das Lysin der Schiffsbasis und 11-*cis*-Retinal sind *rot*. Dargestellt ist das Homologiemodell des humanen Rhodopsins auf der Basis der Kristallstruktur des bovinen Rhodopsins (pdb-id: 1U19 [96]).

Die zweite auffällige Region ist zwischen der Schiffschens Base und dem hochkonservierten NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motiv platziert und beinhaltet die Aminosäuren 297-299 (Abbildung 1.14, orange Oberfläche). Bemerkenswert bei dieser ist, dass sich trotz der zunächst fehlenden Systematik die sequenzielle Variabilität über eine Permutation von nur drei bestimmten Aminosäuren erstreckt (Abbildung 1.15b). Dabei handelt es sich um Alanin, Serin und Threonin, auf der einen Seite flankiert durch das Lysin der Schiffschens Base, auf der anderen durch eine hydrophobe Seitenkette. Eine mögliche Ursache hierfür liefern unter anderem die bereits angesprochenen theoretische Berechnungen und Energie-



**Abbildung 1.15: TEC- und SB-Regionen der Mammalia**

**a, b)** Die relative Wahrscheinlichkeit des Vorkommens einer bestimmten Aminosäure in den Sequenzen der verfügbaren Säuger-Rhodopsine (Anhang, Abbildung 6.1). Farbgebung nach Zappo. **a)** Im Sequenzbereich 190-200 (TEC-Region: 194-198) **b)** Im Sequenzbereich 294-304 (SB-Umgebung, variable Region (297-299) zwischen dem Lysin der Schiffschens Base K296 und NPxxY-Motiv.

minimierungen der besagten Region. Hier gibt es nicht nur direkte Kontakte mit der Bindungstasche, sondern auch mit den ausgedehnten Wassertaschen, die bis an die cytoplasmatische Oberfläche des Rezeptors heranreichen. Die Interaktion der besagten Seitenketten mit den Wassermolekülen, besser noch, die Ausrichtung des unmittelbar an der Schiffschens Base liegenden Wassers wird dabei maßgeblich durch die elektrostatischen Eigenschaften dieser Seitenketten beeinflusst. Die Zugänglichkeit des Wassers an die Schiffschens Base und die damit direkt verbundene Protonenaufnahme sind essentiell für die effektive Deprotonierung der Base und als Folge dessen ist dies auch der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Entstehung der aktiven Spezies.

### 1.6.2 Retinitis pigmentosa

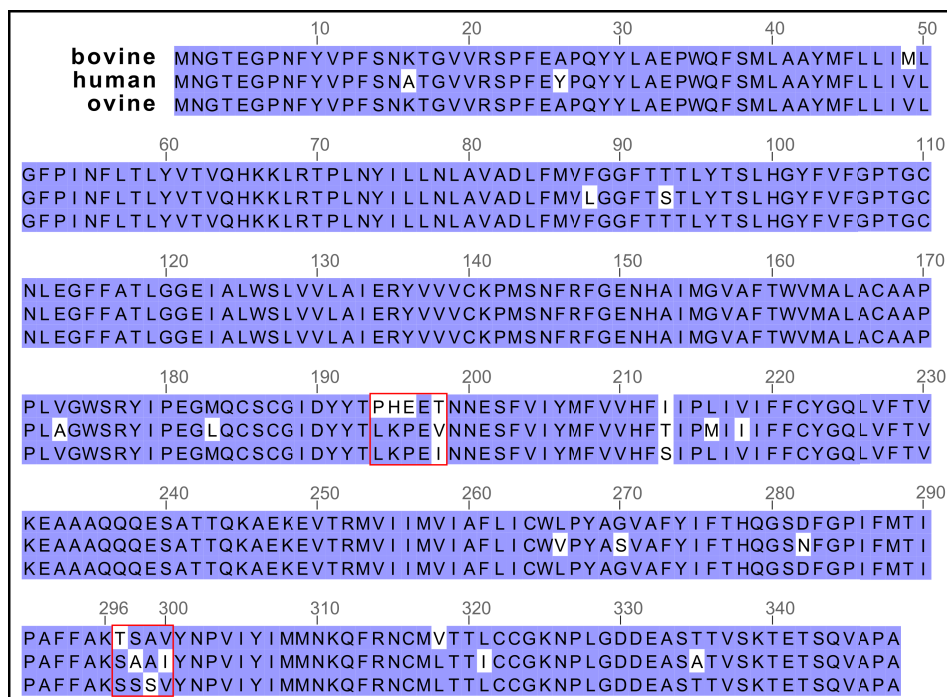
Es sind einige Krankheiten bekannt, die direkt mit einer Fehlfunktion des Lichtrezeptors verbunden sind. Eine davon ist *Retinitis pigmentosa* (RP), die entweder genetisch bedingt ist oder durch eine spontane Mutation ausgelöst werden kann. Diese Erkrankung äußert sich in vielfältigen Phänotypen, wie

Nachtblindheit, Einschränkungen des peripheren Sehens (Tunnelblick) und gestörte Anpassung an verändernde Lichtverhältnisse [122]. Einige Formen dieser Krankheit lassen sich auf Defekte im Rhodopsin zurückführen, wobei sich, soweit zum jetzigen Zeitpunkt bekannt, nicht alle Mutationen auf den Aktivierungsmechanismus des Rezeptors auswirken [123]. Diverse Mutationen betreffen beispielsweise die Proteinbiosynthese von Rhodopsin und führen zur Fehlfaltung oder Aggregation der fertigen Moleküle, andere dagegen resultieren in Störungen des Transports des bereits erfolgreich translatierten Proteins in das Außensegment der Stäbchenzelle. Bisher wurden mehr als 100 Mutationen im Rhodopsin identifiziert, von denen die meisten mit der autosomal dominanten RP assoziiert sind. Eine Zusammenstellung aller bekannten RP verursachenden Mutationen sowie eine Einteilung in Klassen wurde von Elizabeth Rakoczy et al. durchgeführt [124]. Diese Positionen sind in Abbildung 1.12 durch Fettschrift hervorgehoben. Die Untersuchungen der die Krankheit hervorgerufenen Ursachen beschränkten sich bislang auf klinische Studien oder physiologische Experimente, wobei im letzteren Fall transgene Mäuse oder Ratten eingesetzt werden [125]. Das biophysikalische Grundlagenwissen stammt aus den zahlreichen Studien, die am bovinen Rhodopsin durchgeführt worden sind. Es existieren aber auch theoretische Arbeiten, in denen beispielsweise mithilfe eines auf Kristallstrukturen basierenden Proteindesign-Algorithmus' Vorhersagen über die Auswirkungen der jeweiligen Mutation gemacht werden. Dies erlaubt eine Einteilung aller bekannten Mutationen in Klassen, was wiederum gezieltere Strategien und Ansätze für experimentelle Arbeiten ermöglicht. Von A. Singhal et al. konnte eine Kristallstruktur der PR-verursachenden G90D-Mutante des Rhodopsins erarbeitet werden [126].

## **1.7 Schafsrhodopsin**

Als Ergänzung der Studie über den Aktivierungsmechanismus des humanen Rhodopsins wurde Rhodopsin aus Schafsaugen (im weiteren Verlauf als „ovines Rhodopsin“ bezeichnet) untersucht. Obwohl diese Untersuchungen scheinbar keine offensichtliche medizinische Relevanz haben, sind die daraus gewonnenen Erkenntnisse zur Erweiterung und Verallgemeinerung des Grundlagenwissens sehr wichtig. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen (Abbildung 1.16)

dieser Rezeptoren offenbart, dass diese weniger Unterschiede (18 insgesamt) im Vergleich zur Gegenüberstellung von humanem und bovinem Rhodopsin zeigen (hier gab es 23 verschiedene Positionen). So hat beispielsweise die T<sub>5</sub>E<sub>2</sub>C-Region im ovinen Rhodopsin die gleiche Gestaltung wie im humanen. Die Umgebung der Schiffschens Base, auf die explizit bei der Untersuchung des humanen Rhodopsins eingegangen werden wird, unterscheidet sich hier jedoch sowohl von der humanen als auch von der bovinen Sequenz. Interessant an dieser Stelle ist, dass diese Sequenz allerdings der standardmäßigen Abfolge entspricht, die bei Mammalia üblich zu sein scheint (siehe Abbildung 1.14). Die Sequenzen der beiden Paarhufer-Rhodopsine unterscheiden sich lediglich an neun Stellen, die meisten liegen in beiden variablen Regionen (SB-Umgebung und T<sub>5</sub>E<sub>2</sub>C-Region).



**Abbildung 1.16: Alinierung der Aminosäuresequenzen von bovinem, humanem und ovinem Rhodopsin**

Die Gemeinsamkeiten in den Sequenzen sind farblich hinterlegt (hellblau). Die Unterschiede hingegen sind ohne farbliche Markierung. Die T<sub>5</sub>E<sub>2</sub>C-Region, sowie der Bereich zwischen der Schiffschens Base (K296) und dem NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motiv sind rot umrandet.

## 2 METHODEN UND TECHNIKEN

### 2.1 Probenherstellung

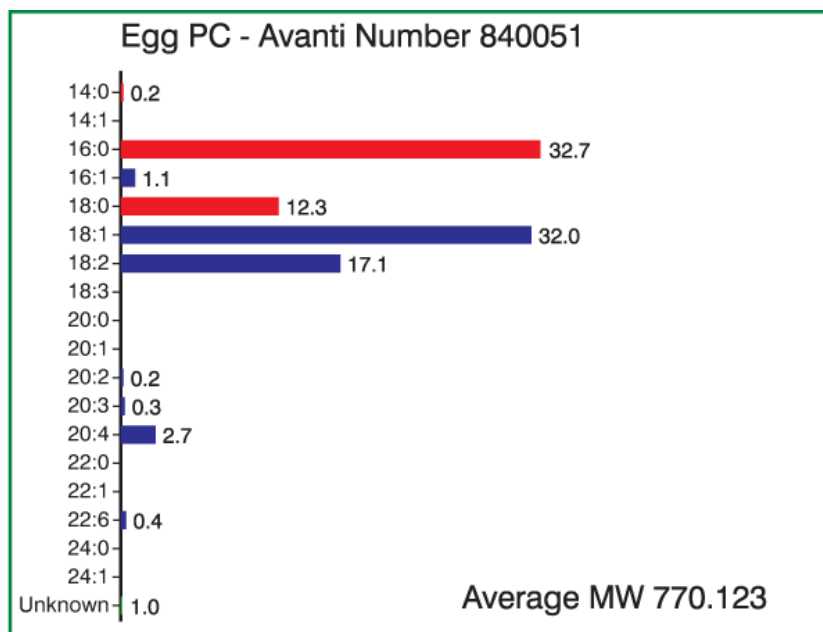
**Herstellung und Isolation der Rhodopsin-Mutanten.** Die Opsinmutanten werden mittels der COS-1-Zelllinie hergestellt, die mit einem entsprechenden Vektor (pMT4-Vektor, *American Type Culture Collection*) transfeziert wird. Nach Inkubation und Ernte werden die Zellen mit Überschuss an 11-*cis*-Retinal (30  $\mu$ M) versetzt, erneut inkubiert und anschließend bei -39°C eingefroren.

Um die Proteine zu extrahieren, werden die Zellen mit einem Detergens (N-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (DDM), Endkonzentration 1%) solubilisiert und für 4 Stunden inkubiert. Rhodopsinmoleküle sowie andere lipophile Proteine lösen sich hierbei aus der Plasmamembran der COS-Zellen und gehen in die Detergensmicellen über. Die Zellreste werden mittels Zentrifugation entfernt. Der Überstand wird mit einem modifizierten 1D4-Gel versetzt. Dieses bindet spezifisch am C-terminalen Ende des Rhodopsins.

Das an das Gel gebundene Rhodopsin wird danach zweimal mit PBS-Puffer (mit 0,03% DDM) und anschließend mit dem BTP-Puffer gewaschen. Nachfolgend werden mehrere Elutionsschritte mit einem 1%igen BTP-OG-Puffer (versetzt 100  $\mu$ M 1D4-Antikörper) durchgeführt, wobei die an das Gel gebundenen Proteine in die OG-Micellen übergehen.

**Künstliche Membrenumgebung (eggPC-Vesikel).** Für die künstliche Membrenumgebung wird in Chloroform gelöstes Phosphatidylcholin (PC) aus dem Hühnerei verwendet. Dieses Phosphatidylcholin weist einen entscheidenden Vorteil gegenüber den reinen Formen von PC mit festdefinierten Fettsäureresten auf. Es besitzt eine gewisse Variabilität in der Verteilung der Fettsäurereste, wovon einige mehrfach ungesättigte Doppelbindungen aufweisen. Eine Übersicht darüber gibt die vom Hersteller öffentlich zur Verfügung gestellte Grafik





**Abbildung 2.1: Verteilung der Fettsäurereste**

Für die Herstellung von Vesikeln wird Phosphatidylcholin aus dem Hühnerei mit der hier angegebenen Verteilung der Fettsäurereste verwendet. (Quelle: *Avanti Polar Lipids Inc.*)

(Abbildung 2.1). Dies stellt eine gute Annäherung an die Zusammensetzung der Lipide in der nativen Disk-Membran dar [127].

**Einbau und Dialyse der Rhodopsinmutanten.** Die Phospholipide werden in eine Glasphiole gegeben, anschließend wird das Chloroform unter einem Abzug mit Argon abgedampft und der Lipidfilm für 4-12 Stunden lyophilisiert, um die Chloroformreste zu beseitigen. Nachfolgend werden die Lipide mit GABI-Puffer (20 mM BTP, 130 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4) auf die Endkonzentration von 3 mg/ml resuspendiert. Diese Suspension wird 5 Gefrier-Tau-Zyklen (1,5 min in flüssigen Stickstoff und 5 min in lauwarmen Wasser) unterzogen und mehrmals durch eine Polycarbonat-Membran mit einer Porengröße von 200 nm gepresst um einheitlich und unilamellare Vesikel zu erhalten. Die Konzentrationen der Eluate werden in einer Zentrifuge (Biofuge 28RS, *Heraeus*) erhöht und für ca. eine Stunde mit der entsprechenden Menge der Vesikelsuspension inkubiert. Diese ergibt sich aus der Rhodopsinkonzentration und dem Protein-Lipid-Verhältnis von 1:100 (ein Beispielprotokoll befindet sich auf der nächsten Seite). Zuletzt wird das Protein-Lipid-Detergensgemisch 3-6 Tage unter Pufferwechsel dialysiert, um das Detergens komplett zu entfernen. Detergenzien sind dafür bekannt, dass sie sich auf die Aktivierungskaskade des Rho-



dopsins [128], insbesondere auf das Meta I / Meta II-Gleichgewicht auswirken. So verschiebt beispielsweise Digitonin dieses Gleichgewicht in Richtung des Meta I-Intermediats, DDM und OG hingegen in Richtung der aktiven Spezies. Nach der Dialyse findet eine Überprüfung der Reinheit der hergestellten Proben mithilfe der UV-Vis-Spektroskopie statt. Hierfür wird ein Aliquot von 70-100 µl eine Stunde lang bei ca. 200000g zentrifugiert. Wenn im Überstand anhand der Absorption bei 500 nm keine solubilisierten Rhodopsine mehr festgestellt werden können, bedeutet dies eine komplette Befreiung der Probe vom Detergens. Die fertigen Proben werden schließlich lichtgeschützt bei -39°C aufbewahrt.

Bedingt durch die Prozedur, die pro Rhodopsinmutante ca. eine Woche dauert, die zahlreichen Reinigungsschritte, aber auch aufgrund der Spezifität der Mutation, fällt ein Teil des Proteins aus, sodass die letztendliche Ausbeute ca. 2-20 nmol beträgt.

### Protokoll der Vesikelherstellung

#### Einbau

Protein zu Lipid: 1:100

$c_{\text{Rhodopsin}} = 2\text{-}20 \text{ } \mu\text{M}$        $c_{\text{OG}} = \text{mind.} 100 \text{ mM}$

$c_{\text{Lipid in Chloroform}} = 25 \text{ mg/ml}$  (Stammlösung)

$M_{\text{eggPC}} = 770,12 \text{ g/mol}$

<b>Lipid:</b>	<b>µmol</b>	<b>mg</b>	<b>µl der Stammlösung</b>
100% eggPC	5	3,85	154

ml Puffer: 1,283
------------------

→ Stocklösung 3 mg/ml

$c_{\text{Lipidsuspension}} = 3,9 \text{ mM}$

Die nativen Rhodopsine wurden aus Rinder- und Schafsaugen (*Teterower Fleisch GmbH*) gewonnen. Die Retinae werden dabei aus den Augen präpariert. Zur Gewinnung der WM-Fraktion (*washed membranes*), die für infrarotspektroskopische Messungen verwendet wird, werden die Außensegmente extrahiert, hypotonisch lysiert und mehrmals gewaschen. Die gesamte Proze-

dur wird nach dem Protokoll von Papermaster durchgeführt und ist hier [129] nachzulesen.

**Aufbau und Konfiguration der Messungen.** Bei allen Proben erfolgt die Einstellung des pH-Wertes mit 0,01-0,1M Salzsäure (HCl) bzw. 0,01-0,1M Natronlauge (NaOH). Anschließend werden die Proben in einer gekühlten Ultrazentrifuge bei ca. 200000g konzentriert, der Überstand wird verworfen und das Pellet zwischen zwei BaF<sub>2</sub>-Kristallscheiben mit einem Abstand von ca. 3 µm in der Messkammer platziert. Die Probe kann dann, je nach Untersuchungsziel, über einen sehr großen Temperaturbereich bei einer bestimmten Temperatur äquilibriert werden. Hierfür werden entweder die Ethanol-Kühlung (223K-293K) CC175 der Firma Huber, der Stickstoff-Kryostat (80K-273K) der Firma Oxford Instruments oder die Frostschutzkühlung (253K-360K) RC6 CS der Firma Lauda verwendet. Alle Arbeiten mit den lichtempfindlichen Proben, wie die Augen, das Rhodopsin, die COS-Zellen, sowie die Rhodopsinmutanten werden ausschließlich unter Rotlicht ( $\lambda > 680$  nm) durchgeführt.

Alle FTIR-spektroskopischen Messungen wurden an einem Bruker ifs66v/s IR-Spektrometer durchgeführt. Für die simultane Datenaufnahme im UV-visuellen Bereich wurde das IR-Spektrometer mittels Glasfaseroptik an einen OLIS RSM UV/Vis-Spektrometer gekoppelt. Die initiale Belichtung der Probe erfolgte für 10 s während der Messung mit a) orangen LEDs ( $\lambda_{\text{max}}=580$  nm) bei späten Intermediaten (Meta I und Meta II), b) grünen LEDs ( $\lambda_{\text{max}}=520$  nm) bei Lumi und c) hellblauen LEDs ( $\lambda_{\text{max}}=470$  nm) bei Batho. Die Datenaufnahme erfolgte im *rapid-scan*-Modus mit einer variablen zeitlichen Auflösung  $>171$  ms und einer spektralen Auflösung von  $2\text{ cm}^{-1}$  im Bereich zwischen  $1800\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ . Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses wurde stets ein Tiefpassfilter ( $1850\text{ cm}^{-1}$ ) verwendet. Die gewonnenen Daten wurden linear korrigiert, um die temperaturabhängigen Schwankungen zu eliminieren und je nach Messung auf bestimmte Banden normalisiert (hierzu mehr im Abschnitt 2.2.6). Mittels SVD (*singular value decomposition*) und *global-fit*-Prozedur wurden die Übergangskomponenten mit den dazugehörigen Kinetiken errechnet [130].

### 2.1.1 Ovines Rhodopsin

In dieser Studie wird ein tatsächlicher Wildtyp, d.h. ein direkt aus Schafsaugen gewonnener Rezeptor untersucht. Diese Neuerung hat zwei Gründe: Zum

einem sind derartige Proben sind deutlich kostengünstiger zu erzeugen und dementsprechend in vielfach höheren Mengen vorhanden als die künstlich hergestellten Analoga. Zum anderen wurde nichtsdestotrotz ein Versuch unternommen, wegen der genaueren Vergleichsmöglichkeiten untereinander, das ovine Rhodopsin über das COS-Expressionssystem herstellen zu lassen. So ließen sich die Lichtrezeptoren aus allen drei Organismen einem direkten Vergleich unterziehen. Dabei hat sich jedoch herausgestellt, dass sich in die in der Datenbank vorhandene Sequenz fehlerhaft ist [131]. Erst als die aktualisierte Version des Schafgenoms publiziert worden war [132], wurde es möglich, die tatsächliche sequentielle Abfolge des ovinen Rhodopsins aus der DNA zu bestimmen. Und obwohl nun in der folgenden Abhandlung das natürlich gewonnene ovine Rhodopsin in der natürlichen Diskmembran mit dem künstlich hergestellten humanen und bovinen Rhodopsin in künstlichen Vesikeln verglichen wird, kann man sich auf die Beobachtungen stützen, die in der Arbeitsgruppe mit dem bovinen Rhodopsin gemacht worden sind. Hier konnte nämlich gezeigt werden, dass es nahezu keine Unterschiede zwischen dem natürlich gewonnenen, in der nativen Diskmembran vorliegenden und dem künstlich hergestellten, in künstliche Vesikel eingelagerten Rhodopsin existieren.

## **2.2 Spektroskopie**

### **2.2.1 Infrarot-Spektroskopie**

Die Infrarot-Spektroskopie (IR-Spektroskopie) ist eine nicht-invasive schwingungsspektroskopische Methode, da die Energie des infraroten Lichtes nur zur Anregung von Molekülschwingungen ausreicht. Die Detektion der Absorption im Bereich von 2,5 bis 250  $\mu\text{m}$  ( $40\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ ) wird unter anderem zur Analyse der Struktur und Dynamik von Biomolekülen, deren Größe bis zu einigen 100 kDa sein kann, verwendet. In Analogie zum harmonischen Oszillator aus der klassischen Mechanik ist die Schwingungsfrequenz einer atomaren Bindung von der Stärke dieser Bindung (Einfach-, Doppel-, Dreifach-Bindung) und den gekoppelten Atommassen abhängig. Demzufolge sind charakteristische Wellenzahlenbereiche des Spektrums der Absorption bestimmter Gruppen und Verbindungen unterschiedlicher atomarer Zusammensetzungen zugeordnet. Zudem

wird die Schwingungsfrequenz durch die Umgebung der jeweiligen Gruppe moduliert.

Analog zur UV/Vis-Spektroskopie wird die Intensität des transmittierten Lichts durch das Lambert-Beer'sche Gesetz beschrieben:

$$E = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon cd$$

Hierbei ist E – die Extinktion, I – die Anfangsintensität,  $I_0$  – die Intensität des transmittierten Strahlung,  $\epsilon$  – der Extinktionskoeffizient (Absorptionskoeffizient, l/mol\*cm), c – die Konzentration der Probe (mol/l) und d – die Schichtdicke (cm).

Die Absorption der infraroten Strahlung folgt bestimmten Auswahlregeln: Sie findet nur dann statt, wenn die Dipolmomente des elektrischen Vektors der Strahlung und des Moleküls gleichgerichtet sind und demzufolge miteinander derart wechselwirken, dass sich das elektrische Moment während des Überganges ändert. Solche Schwingungen werden als IR-aktiv bezeichnet und sind im IR-Absorptionsspektrum sichtbar.

### 2.2.2 FTIR-Spektroskopie

Gegenüber der klassischen dispersiven IR-Spektroskopie bietet die FTIR-Spektroskopie eine Reihe von Vorteilen, weshalb diese Methode am häufigsten verwendet wird. Die IR-Strahlung einer Quelle (meistens ein Globar, d.h. ein unter Hochspannung stehender Siliziumcarbid-Stab) wird zunächst in einen Michelson-Interferometer eingeleitet. Hier wird die einfallende Strahlung mittels eines Strahlenteilers (halbdurchlässiger Spiegel aus germanium-beschichteten KBr in 45° Winkel zur Ausbreitungsrichtung der einfallenden Strahlung platziert) in zwei Teilstrahlen aufgespaltet. Der eine Teilstrahl wird anschließend von einem festpositionierten Spiegel reflektiert, der zweite dagegen von einem sich mit konstanter Frequenz bewegendem Spiegel. Bei der Überlagerung der beiden Lichtstrahlen, die wegen der räumlichen Kohärenz und in Abhängigkeit von ihrer Phasendifferenz miteinander interferieren, entsteht ein Interferogramm. Dieses enthält Informationen über alle Frequenzen der Lichtquelle, die simultan die Probe passieren und dadurch eine deutlich höhere zeitliche Auslösung als beim dispersiven Spektrometer ermöglichen (Multiplex-Vorteil). Die höhere Intensität der Strahlung, die durch die Verwendung kreisförmiger Aperturen anstatt eines Spalts, erreicht wird (Jacquinot-Vorteil). Die genaue Positionsbe-

stimmung des beweglichen Spiegels durch einen in die Optik eingekoppelten Laser ermöglicht eine präzise Wellenzahlkalibrierung des Spektrometers (Connes-Vorteil).

Nach dem Durchgang durch die Proben wird das Signal von einem mit flüssigen Stickstoff gekühlten MCT-Detektor aufgezeichnet und mittels Fourier-Transformation in ein Spektrum umgerechnet. Eine ausführliche Beschreibung der mathematischen Grundlagen der Fourier-Transformation sowie der FTIR-Datenverarbeitung findet sich hier [133].

### 2.2.3 FTIR an Proteinen

Ein Protein (allgemein ein Makromolekül) kann als nicht-lineares, gekoppeltes System aus  $N$  Atomen verstanden werden. Dieses besitzt  $3N$  Freiheitsgrade der Bewegung. Die Translation des Schwerpunkts und die Rotation um den Schwerpunkt haben ebenfalls jeweils drei Freiheitsgrade. Somit bleiben  $3N-6$  Freiheitsgrade für die Normalschwingungen (Vibrationen). Die Atombewegungen innerhalb dieses Systems werden durch eine Superposition dieser Normalschwingungen beschrieben. Demzufolge treten in einem Protein ( $N > 1000$ ) viele gekoppelte Schwingungen auf, was zu einem Spektrum mit zahlreichen überlappenden Banden führt.

In einem Makromolekül können zwei Arten von diesen mechanischen Schwingungen unterschieden werden. Als Valenz- oder Streckschwingungen werden Schwingungen in Richtung der Bindungsachse zweier Atome oder Molekülteile durch eine Dehnung oder Stauchung der Bindung bezeichnet. Normalschwingungen, die unter Deformation des Bindungswinkels ablaufen, nennt man dementsprechend Deformations- oder Biegeschwingungen. Die beiden Schwingungsarten können symmetrisch oder antisymmetrisch auftreten. Da viele funktionelle Gruppen sowohl Deformations- als auch Valenzschwingungen ausführen können, sind mehrere zu einer Gruppe gehörende Banden möglich. Umgekehrt können mehrere Gruppen bei gleicher Wellenlänge absorbieren und somit zu einer Bande beitragen. Auf diese Weise entstehen entartete Schwingungen, die besonders schwer zu untersuchen und zu interpretieren sind.

Die symmetrischen Streckschwingungen der Gerüstelemente (C-C, C=C, C=C, N=N usw.) sowie Schwingungen von homonuklearen zweiatomigen Mole-

külen (N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>) zeigen keine Infrarotabsorption, da sich die Veränderungen der Dipolmomente aufgrund der symmetrischen Kernbewegungen aufheben. Dementsprechend eignet sich die IR-Spektroskopie für die Untersuchung von funktionellen Gruppen, die meistens unsymmetrisch sind und unregelmäßig in den entsprechenden Molekülen vorkommen. In der nachfolgenden Tabelle sind auszugsweise einige relevante Schwingungen zusammengefasst. Ein genauer Überblick über die einzelnen Schwingungsmodi mit den dazugehörigen Extinktionskoeffizienten ist hier [134] zu finden.

Gruppe / Schwingung	Position [cm <sup>-1</sup> ]	Quelle
Amid-I / $\nu(\text{C=O})$	1700-1600	[134]
Amid-II / $\nu(\text{C-N})$ , $\delta(\text{C-N-H})$	1580-1480	[134]
Asp, Asn, Gln, Glu, Arg / $\nu(\text{C=O})$	1668-1770	[134]
Asp83	1768/1748	[19]
Glu122	1727	[24]
Glu113	1712	[54]
Guanidinium (Arg) / $\nu_{\text{s/as}}((\text{CN}_3\text{H}_5)^+)$	1614-1695	[134]
Tyr-OH / $\nu(\text{C-C})$ , $\delta(\text{C-H})$	1614-1621	[134]
Trp / $\nu(\text{C-C})$ , $\nu(\text{C=C})$	1622	[134]
Tyr-OH / $\nu(\text{C-C})$ , $\delta(\text{C-H})$	1516-1518	[134]
Asp, Glu / $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$	1556-1579	[134]
Tyr-O <sup>-</sup> / $\nu(\text{C-C})$ , $\nu(\text{C-O})$	1269-1274	[134, 135]
Tyr-OH / $\nu(\text{C-C})$ , $\nu(\text{C-O})$	1235-1270	[134]
11- <i>cis</i> -Retinal / $\nu(\text{C-C})$ , $\delta(\text{C-H})$ , $\delta(\text{N-H})$	1238	[19]
Tyr-OH / $\delta(\text{COH})$	1169-1260	[134]
HOOP / $\gamma(\text{C-H})$ , $\gamma(\text{O-H})$	<1000	[19, 136, 137]

**Tabelle 1: Einige Bandenlagen im mittleren Infrarot**

Auswahl wichtiger Schwingungen mit dazugehörigen Referenzen.  $\nu$  - Streckschwingung,  $\delta$  - Deformationsschwingung,  $\gamma$  - Deformationsschwingung aus der Ebene (z.B. HOOP – *hydrogen out of plane*), s - symmetrisch, as - antisymmetrisch.

## 2.2.4 Methoden der FTIR-Spektroskopie

Neben der ortsspezifischen Mutagenese ist die Verwendung von Chromophoranaloga mit Modifikationen der Polyen-Kette, des  $\beta$ -Iononrings oder der Methylgruppen eine weit verbreitete Methode bei Untersuchungen des Aktivierungsmechanismus des Rhodopsins [138-141]. Aufgrund der veränderten

Kopplungen dieser Analoga mit der Umgebung bzw. im Falle der Mutanten der Interaktionen der Seitenketten untereinander, ändern sich auch dazugehörige Banden in ihrer Intensität oder Position. Dies erlaubt eine gezielte Bandenzuordnung zu bestimmten Vorgängen im Rezeptor. Eine präzise Zuordnung der Schwingungen ist allerdings nur mittels Isotopenmarkierung von Aminosäuren möglich. Diese Methode befindet sich zur Zeit im Entwicklungsstadium. Dabei werden  $^{15}\text{N}$ - oder  $^{13}\text{C}$ -markierte Analoga der natürlichen Aminosäuren eingesetzt und somit die Beeinflussungen der Proteinstruktur, wie das bei der Verwendung von Mutanten der Fall ist, nahezu ausgeschlossen.

Spezifische Interaktionen des Rhodopsin mit weiteren Proteinen des Signaltransduktionskaskade, wie z.B. G-Protein oder Arrestin, können mittels Komplexbildungsspektren (*peptide binding spectra*, *pbs*-Spektren) des Rhodopsins mit den Peptiden aus den Bindungsdomänen dieser Proteine studiert werden [7] [142]. Dabei können diese Peptide ebenfalls isotopenmarkiert werden [143].

**Deuterierung.** Der Austausch des Wassers der Probe gegen das schwere Wasser ( $^2\text{H}_2\text{O}$ , Deuteriumoxid) ist die übliche Strategie um protonierungsbedingte Änderungen im Infrarotspektrum genauer zuordnen zu können bzw. diese Änderungen von solchen unterscheiden zu können, die von den Wassermolekülen unbeeinflusst sind. Hierfür wird die Probe mehrmals mit dem Puffer gleicher Zusammensetzung wie der Standartpuffer allerdings auf  $^2\text{H}_2\text{O}$ -basis gewaschen und inkubiert um möglichst alle Wassermoleküle auszutauschen. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgt dementsprechend mit NaOD bzw. DCl.

### 2.2.5 Differenz-Spektroskopie

Ein FTIR-Absorptionsspektrum (Einkanalspektrum) enthält nicht nur Informationen über die Probe, sondern auch über das Emissionsspektrum der Lichtquellen und die spektrale Sensitivität des Detektors. Die Absorptionsänderungen in der Probe, die infolge der Veränderungen der Probe entstehen (z.B. Konformationsänderungen eines Proteins) sind so gering, dass sie im Einkanalspektrum nicht sichtbar sind. Daher bedient man sich im Falle des Rhodopsins der Differenzbildung und betrachtet entsprechende Übergangsspektren. Dabei wird das Einkanalspektrum des dunkeladaptierten Zustands vom Einkanalspektrum des belichteten Zustands subtrahiert. Diese Spektren enthalten Informationen über wegfallende Schwingungen des dunkeladaptierten Zustands (negative

Banden, im Text verdeutlicht durch ein hochgestelltes Minuszeichen vor der Wellenzahl, z.B.  $^{-1238\text{ cm}^{-1}}$ ) und neu entstandene Schwingungen des belichteten Zustands (positive Banden, hochgestelltes Pluszeichen, z.B.  $^{+1745\text{ cm}^{-1}}$ ).

Um mutationsbedingte Einflüsse auf den Aktivierungsmechanismus besser analysieren zu können, werden sogenannte Doppeldifferenzspektren (im weiteren Verlauf  $_{dd}$ Spektren) errechnet. Dabei werden die Differenzspektren der Mutante und der Referenz (zumeist Wildtyp) bei gleichen Bedingungen (Temperatur und pH-Wert) aufeinander normiert (siehe Abschnitt 2.2.6) und das Spektrum der Referenz vom Spektrum der Mutante abgezogen. Die sich daraus ergebenden Abweichungen ( $_{dd}$ Banden) reflektieren mutationsbedingte Einflüsse auf das jeweilige Intermediat.

### 2.2.6 Normierung der Spektren

Eine große Herausforderung bei der Datenanalyse und -interpretation stellt die Normierung der Spektren für den direkten Vergleich mit den Basisspektren dar. Mit dem Ziel, die spektralen Unterschiede und Einflüsse der inkorporierten Aminosäure möglichst gut sichtbar zu machen, werden stets unterschiedliche Bereiche für die Normierung ausgewählt. Das oberste Gebot dabei ist, dass für die Bildung der Doppeldifferenz (d.h. der Normierung der Spektren aufeinander) solche Bereiche ausgesucht werden, von denen man sicher sagen kann, dass die strukturelle Änderung durch die Mutation unbeeinflusst ist. Hierfür wird in den meisten Fällen die *fingerprint*-Bande des Retinals bei  $^{-1238\text{ cm}^{-1}}$  verwendet.

Die Normierung kann sich durchaus schwierig gestalten, vor allem, wenn Mutationen an bestimmten funktionellen Stellen im Protein eingefügt werden, die unmittelbar nach der Isomerisierungsreaktion Veränderungen unterliegen. Denn einerseits bilden sich eben diese funktionellen Stellen spektral ab, andererseits können sie einen Einfluss auf die gesamte Aktivierungskaskade und den Dunkelzustand ausüben. Ein Paradebeispiel für eine solche Region ist die Bindungstasche. So entsteht beispielsweise bei der Belichtung der Y191F-Mutante durch die Rückisomerisierung des *all-trans*-Retinals zu *9-cis*-Retinal ein größerer Anteil an Isorhodopsin [144], die Normierung der Spektren für den nachfolgenden Vergleich mit den Wildtyp erfolgt daher über den Amid-I-Bereich.



### 2.2.7 Extra-Meta II-assay

Auf den Anteilen der Meta II-Spezies, die unter standardmäßigen Meta I-favorisierenden Bedingungen (pH8, 0°C) entstehen, beruht die Anwendung des sogenannten Extra-Meta II-Assays [145]. Hierbei wird die Probe unter Meta I-Bedingungen mit dem hochaffinen C-terminalen Peptid CT $\alpha$  (G $\alpha$  (340-350) K341L; NH<sub>2</sub>-ILENLKDCGLF-COOH) aus der  $\alpha$ -Untereinheit des Transducins (G $\alpha$ ) versetzt. Das Peptid bindet an die aktive Spezies und entzieht diese aus dem Gleichgewicht, wobei ständig Meta II-Spezies aus dem Meta I-Pool nachgebildet wird, um das Gleichgewicht aufrecht zu erhalten. Auf diese Weise wird die Meta I-Spezies entvölkert und dementsprechend bei denjenigen Mutationen, bei denen das Gleichgewicht zu stark auf die Seite des Meta I-Intermediats verlagert ist, keine peptidinduzierte Bildung der Meta II-Spezies beobachtet.

### 2.2.8 Andere Hilfsmittel

**Verwendete Programmumgebung.** Die Datenaufnahme und Steuerung des FTIR-Spektrometers erfolgte mit dem Programm *Opus* (Bruker Optic GmbH). Die anschließende Verarbeitung der Daten, wie Grundlinienkorrekturen, Singularitätswertezerlegung (svd-Analyse), Anpassungen an Basisspektren und die Berechnung der Doppeldifferenzen wurden mit Hilfe einer von Dr. Matthias Elgeti programmierten Routine für das Programm *MatLab* [146] durchgeführt. Unter der svd-Analyse versteht man eine mathematische Extraktion der unabhängigen Komponenten mit den dazugehörigen Kinetiken [130]. Zur grafischen Darstellung der Kristallstrukturen sowie zur Kalkulation der Bindungslängen wurde das Programm *PyMOL* verwendet [147]. Die Berechnungen der Interaktionen kurzer Proteinabschnitte erfolgten mit dem Programm *LigPlot<sup>+</sup>* [148] [149]. Web-basierte Programme wie *Marvin* [150] und *WebLogo* [151] wurden für die Darstellung der chemischen Formeln bzw. Wahrscheinlichkeitsanalysen des Vorkommens einer Aminosäure bei der Alinierung mehrerer Sequenzen benutzt. Die Alinierung der Aminosäuresequenzen erfolgte mit dem Programm  *JalView* [152], zur Nachbearbeitung der Grafiken wurde das Programm *Inkscape* [153] verwendet. Die Verwaltung der Literaturdatenbank erfolgte schließlich mit dem Programm *Mendeley Desktop* [154].



## 3 ERGEBNISSE

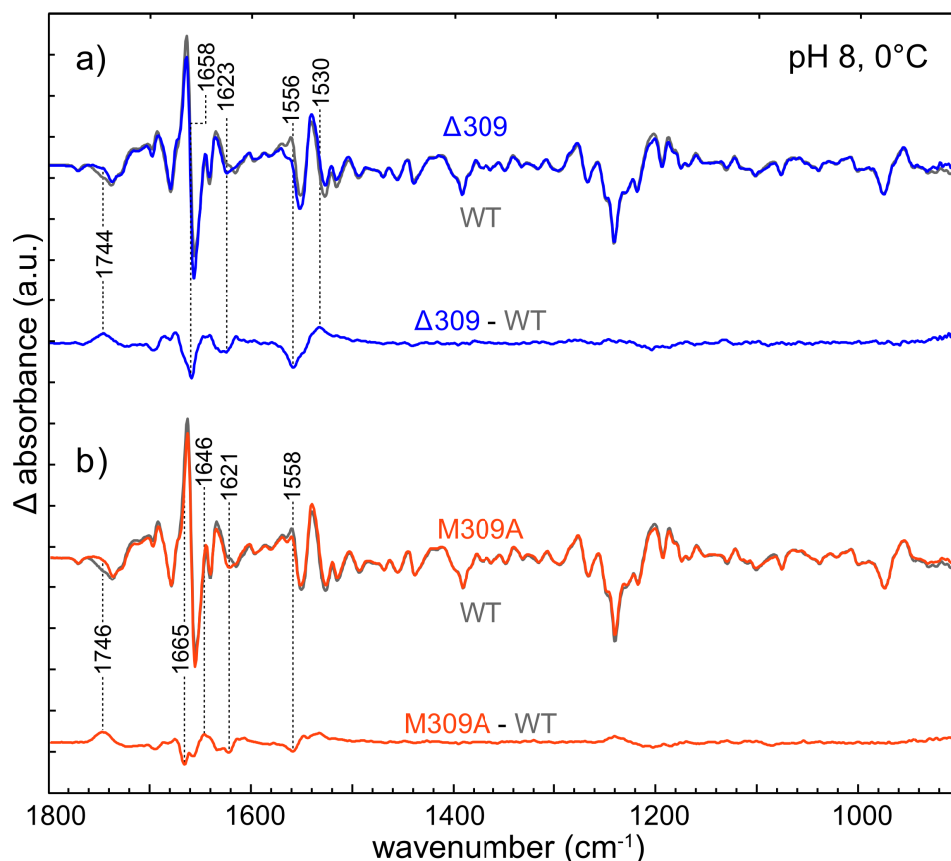
### 3.1 Methionin-Cluster

Die Untersuchungen der Methionin-Mutanten beschränken sich auf die letzten beiden Intermediate der Aktivierungskaskade Meta I und Meta II. Messungen früher Intermediate wurden ausgelassen, da die betrachteten Seitenketten sehr weit von der Bindungstasche entfernt liegen (siehe Abschnitt 1.5.7). Somit kann ein Einfluss der Mutationen auf die Intermediate Batho und Lumi weitgehend ausgeschlossen werden.

Insgesamt wurden für dieses Projekt fünf verschiedene Mutationen hergestellt und untersucht. An den Positionen 253 und 309 wurde Methionin durch Alanin substituiert (M253A und M309A). Dadurch wurde die Hydrophobizität der Seitenkette beibehalten, das beanspruchte Volumen jedoch deutlich verringert und damit direkt verbundene mögliche Interaktionen mit der Umgebung unterbunden. Aufgrund der bekannten Funktion der TM6 bereits bei der Entstehung des Meta I, galt es, die strukturelle Integrität der Helix möglichst unversehrt zu lassen [97, 114]. Daher wurde der Schwerpunkt dieser Untersuchungen auf die Übergangsregion zwischen TM7 und Helix 8 gelegt, genauer gesagt, auf das Methionin 309. Hierfür wurden zwei um eine Aminosäure verkürzte Versionen des Rhodopsins hergestellt, nämlich das  $\Delta 309$  und  $\Delta 308/M309A$  ( $\Delta$  steht für die Deletion einer Aminosäure). Für die Position 257 wurde eine andere Substitution gewählt. Es wurde, allerdings mit anderen Methoden, gezeigt, dass Mutationen an der Position 257 eine konstitutiv aktive Form des Opsins hervorrufen [101]. Die Untersuchung der M257C-Mutante dient einerseits der Verifikation der publizierten Resultate mithilfe der FTIR-Spektroskopie, andererseits kann die reaktive SH-Gruppe des Cysteins zum Anbringen eines Markers und demzufolge für Abstandsmessungen, d.h. Studien, bei denen die Mobilität der sechsten Helix im Aktivierungsprozess bestimmt wird, ausgenutzt werden.

### 3.1.1 Metarhodopsin I

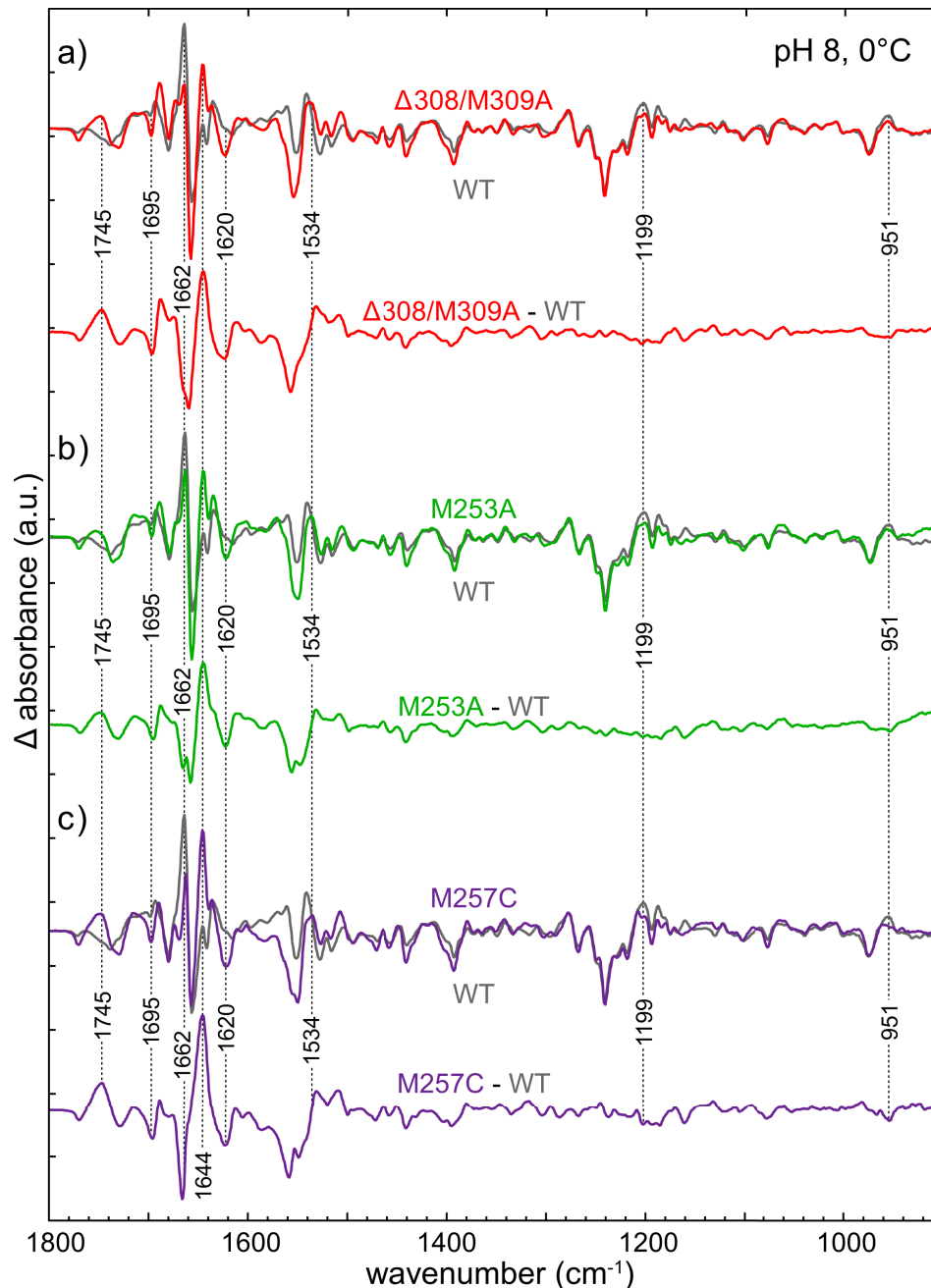
**M309A- und  $\Delta$ 309-Mutanten.** Die Spektren der M309A- und  $\Delta$ 309-Mutanten unter Meta I-Bedingungen ( $0^{\circ}\text{C}$ , pH8) sind mit dem des Wildtyps nahezu deckungsgleich (Abbildung 3.1). Es existieren nur marginale Unterschiede in den Amid-I- und Amid-II-Bereichen, welche durch die  $\Delta$ Spektren reflektiert werden. Die geringfügigen Unterschiede in den Intensitäten, insbesondere im Amid-I-Bereich, beruhen sehr oft auf einem unterschiedlichen Wassergehalt der Probe sowie der Nichtlinearität des Detektors und können dementsprechend bei ein und derselben Probe von Messung zu Messung auftreten. Es gibt hier jedoch eine auffällige Abweichung, die den beiden Spektren gemein ist, nämlich eine Bandenverschiebung bei 1623 bzw. 1621  $\text{cm}^{-1}$ . Das Spektrum der  $\Delta$ 309-Mutante (Abbildung 3.1a) hat außerdem eine deutlich geringere Intensität bei 1559  $\text{cm}^{-1}$ , was durch die korrespondierende  $\Delta$ Bande bei 1556  $\text{cm}^{-1}$  visualisiert wird.



**Abbildung 3.1:  $\Delta$ 309- und M309A-Mutanten unter Meta I-Bedingungen**

**a)** Spektrum der Deletionsmutante  $\Delta$ 309 (blaue Kurve) überlagert mit wt-Spektrum (graue Kurve) **b)** Spektrum der M309A-Mutante (orange Kurve) überlagert mit wt-Spektrum (graue Kurve) **a-b)** die Doppeldifferenzen haben die gleiche Farbdarstellung wie die Spektren der jeweiligen Mutante.

**$\Delta 308/M309A$ -,  $M253A$ - und  $M257C$ -Mutanten.** Die Spektren der drei weiteren in diesem Abschnitt der Arbeit behandelten Mutationen (Abbildung 3.2) zeigen ausgeprägte Banden, die neben Meta I auch deutliche spektrale Komponenten von Meta II enthalten. Dies kann an mehreren Meta II-typischen Banden festgestellt werden. Die positive HOOP-Bande bei  $+951\text{ cm}^{-1}$  weist in allen drei



**Abbildung 3.2:**  $\Delta 308/M309A$ -,  $M253A$ - und  $M257C$ -Mutanten unter Meta I-Bedingungen

a) Spektrum der  $\Delta 308/M309A$ -Doppelmutante (rote Kurve) überlagert mit wt-Spektrum (graue Kurve, auch in b) und c) b) Spektrum der  $M253A$ -Mutante (grüne Kurve) überlagert mit wt-Spektrum c) Spektrum der  $M257C$ -Mutante (violette Kurve) überlagert mit wt-Spektrum a-c) die Doppelabsorptionen haben die gleiche Farbdarstellung wie die Spektren der jeweiligen Mutante

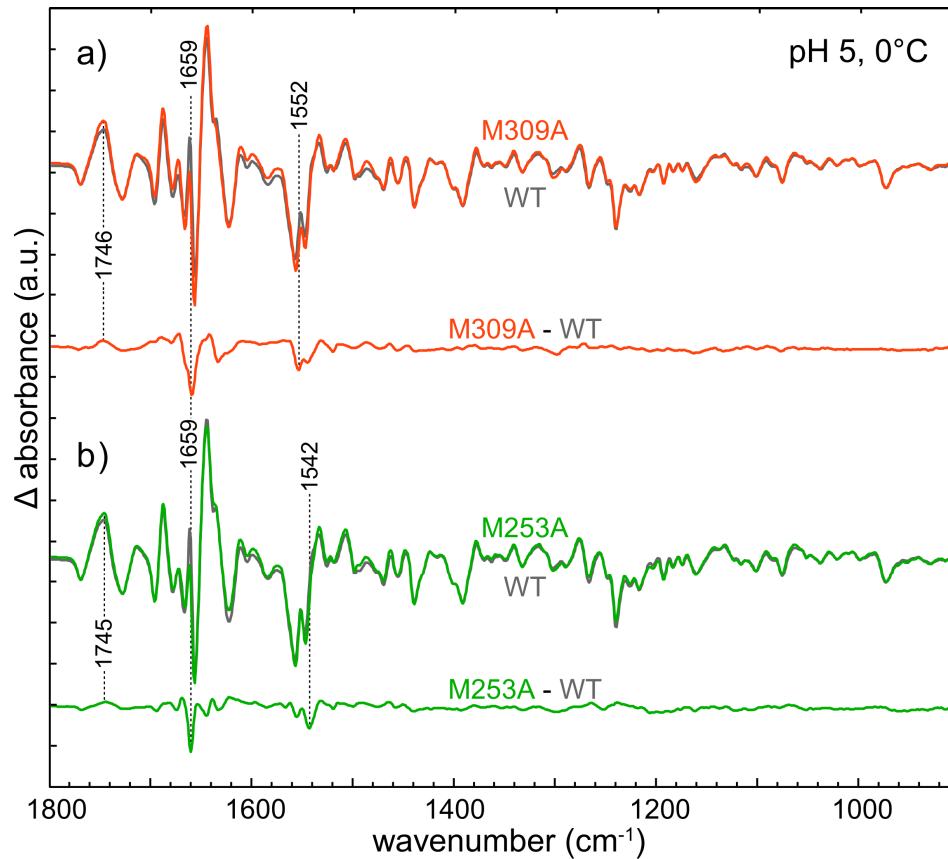
Mutantenspektren eine verminderte Intensität auf, was auf eine vorangeschrittene Relaxation des Retinals hindeutet. Des Weiteren ist die normalerweise bei  $+1538\text{ cm}^{-1}$  vorzufindende Meta I-Markerbande zu  $+1534\text{ cm}^{-1}$  verschoben. Bei einer reinen Meta II-Spezies würde diese Bande ein Maximum bei  $+1532\text{ cm}^{-1}$  besitzen. Darüber hinaus zeigen die Banden in den Carboxyl- und Amid-I-Bereichen der  $_{dd}$ Spektren unmissverständlich, dass es sich bei allen drei hier betrachteten Spektren um Mischspezies handelt, was an der positiven  $_{dd}$ Bande bei  $+1745\text{ cm}^{-1}$  sowie den intensiven  $_{dd}$ Banden bei  $-1662$  und  $+1644\text{ cm}^{-1}$  zu sehen ist.

Um eine mögliche Verschiebung des Meta I / Meta II-Gleichgewichts in Richtung der aktiven Spezies zu untersuchen, wurden die jeweiligen Spektren an die Linearkombination aus Meta I- und Meta II-Basispektren angepasst. Mittels dieser Kalkulation lässt sich der Anteil des jeweiligen Intermediats im Mischspektrum bestimmen. Diese Berechnungen ergaben bei  $\Delta 308/\text{M309A}$ - und  $\text{M253A}$ -Mutanten ca. 80% Meta II-Spezies unter Meta I-favorisierenden Bedingungen und damit eine deutliche Verschiebung des Gleichgewichts. Das Spektrum der  $\text{M257C}$ -Mutante ist zu 90% in Richtung der aktiven Spezies verlagert. Die Substitution des Methionins mit Cystein an Position 257 ist bereits dafür bekannt eine konstitutiv aktive Form des Opsins zu erzeugen [101]. Daher ist die vorliegende Messung (Abbildung 3.2c) eine Verifizierung der Ergebnisse mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie und dient dazu, das Gesamtbild zu vervollständigen.

Die besagten Verschiebungen des Gleichgewichts in Richtung der aktiven Spezies stellen im Prinzip den wichtigsten Befund bei den Untersuchungen der Funktion des Methionin-Clusters dar.

### 3.1.2 Metarhodopsin II

**M309A- und M253A-Mutanten.** Abbildung 3.3 zeigt die Übergangsspektren vom Grundzustand nach Meta II<sub>b</sub>H<sup>+</sup> (0°C, pH5) der  $\text{M309A}$ - und  $\text{M253A}$ -Mutanten. Diese beiden Substitutionen zeigen die geringste Beeinflussung dieses Überganges, was sich in wenigen und relativ schwach ausgeprägten  $_{dd}$ Banden äußert. Die Divergenzen betreffen die Bereiche der Amid-I- und Amid-II-Schwingungen. Zudem lässt sich bei beiden  $_{dd}$ Spektren auch eine kleine positive Bande im Bereich der Carboxylschwingungen um  $+1745\text{ cm}^{-1}$  beobachten.

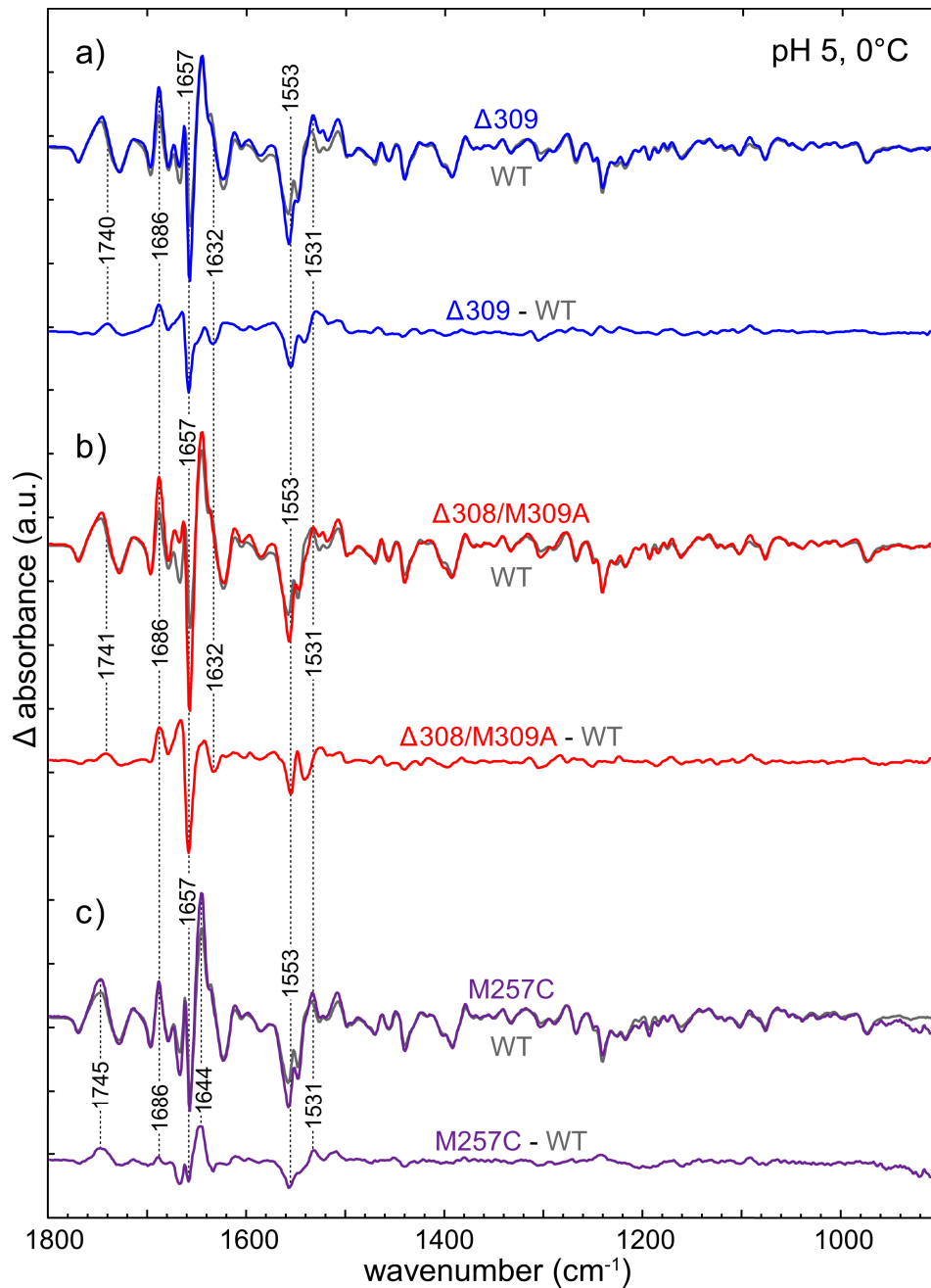


**Abbildung 3.3: M309A- und M253A-Mutanten unter Meta II-Bedingungen**

**a)** M309A-Mutante (orange Kurve) überlagert mit wt-Basispektrum (pH5, 0°C; graue Kurve, ebenfalls in **b**)). **b)** M253A-Mutante (grüne Kurve) überlagert mit wt-Basispektrum. **a-b)** die Doppeldifferenzen haben die gleiche Farbdarstellung wie die Spektren der jeweiligen Mutante.

Neben der markanten negativen  $\Delta\delta$ -Bande bei  $\sim 1659\text{ cm}^{-1}$  deutet dies darauf hin, dass die beiden Mutationen sich, wenn auch nur geringfügig, auf das Meta I / Meta II-Gleichgewicht auswirken und dieses etwas in Richtung der aktiven Spezies verschieben.

**$\Delta 309$ -,  $\Delta 308/\text{M309A}$ - und  $\text{M257C}$ -Mutanten.** Alle drei in Abbildung 3.4 dargestellten Spektren weisen einen höheren Meta II-Gehalt auf. Das kann zum einen anhand der intensiveren Banden in den Amid-I- und Amid-II-Bereichen festgestellt werden, was durch die zahlreichen  $\Delta\delta$ -Banden um  $1650$  und  $1540\text{ cm}^{-1}$  abgebildet wird. Zum anderen aber steht die positive Bande bei  $\sim 1745\text{ cm}^{-1}$  für protoniertes Asp83. Sie ist bei allen drei Mutanten stärker ausgeprägt als im  $\text{wt}$ -Spektrum. Dies äußert sich in der breiten positiven  $\Delta\delta$ -Bande, die bei der jeweiligen Mutante etwas anders positioniert ist. Die Spektren der  $\Delta 309$ - und  $\Delta 308/\text{M309A}$ -Mutanten weisen darüber hinaus ein weiteres gemeinsames Merkmal auf. Die negative Bande des Dunkelzustand  $\rightarrow$  Meta II-Übergangs bei



**Abbildung 3.4:**  $\Delta 309$ -,  $\Delta 308/M309A$ - und  $M257C$ -Mutanten unter Meta II-Bedingungen

**a)**  $\Delta 309$ -Mutante (blaue Kurve) überlagert mit wt-Basissspektrum (pH5, 0°C; graue Kurve, ebenfalls in **b-c**). **b)**  $\Delta 308/M309A$ -Mutante (rote Kurve) überlagert mit wt-Spektrum. **c)**  $M257C$ -Mutante (violette Kurve) überlagert mit wt-Spektrum. **a-c)** Die Doppeldifferenzen haben die gleiche Farbdarstellung wie die Spektren der jeweiligen Mutante.

$1657\text{ cm}^{-1}$  ist im Vergleich zur entsprechenden Bande des  $w_t$ -Spektrums deutlich intensiver. Sie deutet auf die andersartige Gestaltung des Grundzustands hin und wurde bereits bei den entsprechenden Spektren des Übergangs zum Meta I-Intermediat beobachtet.



Die Untersuchungen des Methionin-Clusters beinhalteten neben den hier vorgestellten Experimenten noch weitere, z.B. solche unter Bedingungen, die die Bildung der reinen aktiven Spezies Meta II<sub>b</sub>H<sup>+</sup> (pH5, 30°C) oder der Mischspezies aus allen Meta I- und Meta II-Intermediaten (pH8, 30°C) favorisieren. Da die inkorporierten Mutationen jedoch nahezu keinen Einfluss auf die Entstehung der G-Protein-bindenden Spezies haben, wird die Darstellung im Rahmen dieser Arbeit ausgelassen.

### 3.1.3 Fazit

Die Spektren unter Meta I-stabilisierenden Bedingungen können in zwei Gruppen unterteilt werden: Während Δ309 und M309A keine signifikante Beeinflussung des Übergangs nach Meta I aufweisen, zeigen die drei restlichen Mutationen (Δ308/M309A, M253A und M257C) eine starke Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung der aktiven Spezies. Diese Verschiebung spiegelt sich in allen spektralen Bereichen wieder, wobei die Doppeldifferenzen untereinander nahezu deckungsgleich sind, was für eine annähernd gleichartige Beeinflussung des Aktivierungsmechanismus des Rhodopsins durch alle hier zusammengefassten Mutationen spricht. Die Bildung von Meta II<sub>b</sub>H<sup>+</sup> ist hingegen nur geringfügig (M309A, M253A) bis mittelmäßig (Δ309A, Δ308/M309A und M257C) beeinflusst, wobei im letzten Fall die aktive Spezies selbst betroffen ist.

## 3.2 Tyrosine

Alle hier vorgestellten Tyrosinmutationen liegen entweder in der Bindungstasche oder in deren unmittelbaren Umgebung (siehe Abbildungen 1.10 und 1.11). Daher werden Einflüsse auf den Aktivierungsmechanismus auch bei den frühen Intermediaten erwartet und beobachtet. Die Rolle und Funktionsweise von Tyrosinseitenketten kann am besten und mit der geringsten Störung der Proteinstruktur untersucht werden, wenn Tyrosin mit Phenylalanin substituiert wird [7, 76, 77]. Einerseits bleiben dabei stabilisierende und abschirmende Eigenschaften (hydrophobe Wechselwirkungen, *π-stacking*) erhalten, andererseits ist der Platzbedarf sehr ähnlich, sodass die umliegenden Seitenketten in ihrer Positionierung kaum betroffen werden.

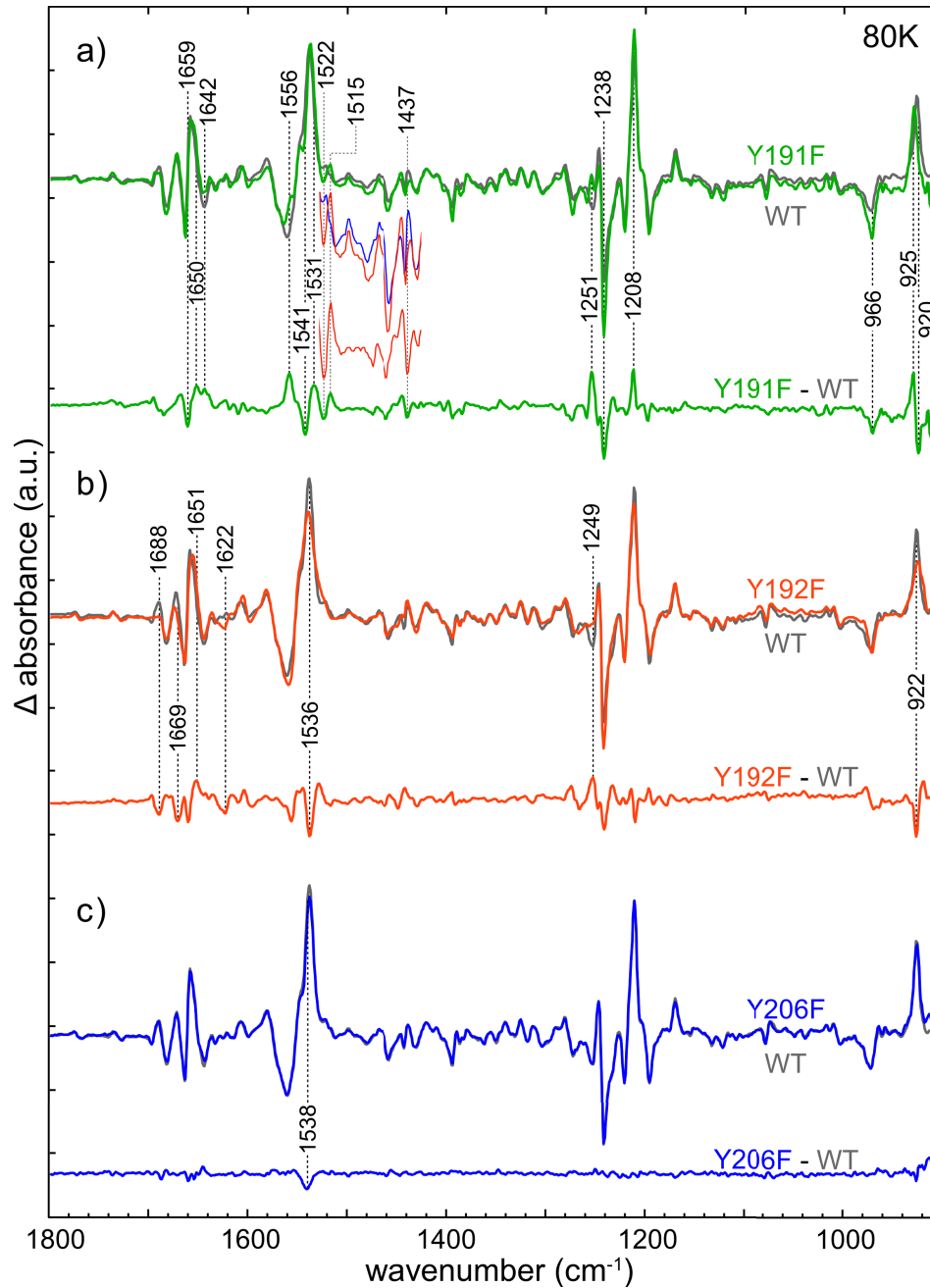
### 3.2.1 Bathorhodopsin

Im ersten stabilisierbaren Intermediat nach der Belichtung (Batho-Zustand) werden ausschließlich Interaktionen vom Chromophor mit der Bindungstasche sowie die Schwingungsmodi des Chromophors selbst abgebildet. Größere Bewegungen der Sekundärstrukturelemente sind aufgrund der tiefen Temperatur nicht zu erwarten.

Alle Tyrosin-Mutanten zeigen über den gesamten *fingerprint*-Bereich typische Banden für den Grundzustand  $\rightarrow$  Batho-Übergang [144]. Die Unterschiede werden im weiteren Verlauf einzeln besprochen.

**Y191F-Mutante.** Die Tyrosinsubstitution an Position 191 zeigt die ersten Abweichungen vom  $w_t$ Spektrum in den Amid-I- und Amid-II-Bereichen, reflektiert durch die Banden bei  $-1659/+1650/+1642\text{ cm}^{-1}$  und  $+1556/-1541/+1531/-1522\text{ cm}^{-1}$  (Abbildung 3.5a). Zur besseren Übersicht ist die Bandendifferenz bei  $-1522\text{ cm}^{-1}$  dreifach gestreckt dargestellt. Dies deckt zusätzliche Details auf, die in der Gesamtdarstellung schwer aufzulösen sind. Während sich im  $w_t$ Spektrum bei  $+1515\text{ cm}^{-1}$  lediglich eine Flanke befindet, zeichnet sich das Spektrum der Mutante durch eine kleine positive Bande aus. Im Bereich um  $1437\text{ cm}^{-1}$  befinden sich kleine Intensitätsunterschiede.

Die zweite Region mit merklichen Unterschieden liegt im Bereich des Chromophors. Es sind mehrere scharfe Banden bei  $+1251/-1238/+1208\text{ cm}^{-1}$  zu sehen, wobei der Fokus auf der Bande bei  $+1251\text{ cm}^{-1}$  liegt. Diese wird durch die Tyrosinseitenketten hervorgerufen [134]. Die Banden bei  $-1238$  und  $+1208\text{ cm}^{-1}$  sowie bei  $+1556\text{ cm}^{-1}$  lassen sich auf einen hohen Anteil an Isorhodopsin zurückführen [144] (siehe Abschnitt 2.2.6). Die Verdrillung des Retinals nach der Isomerisierung wird durch die HOOP-Region abgebildet. Die negative Bande bei  $-966\text{ cm}^{-1}$  ist deutlich größer als beim WT. Auffallend ist auch die Verschiebung der positiven HOOP-Bande, was durch die  $_{dd}$ Banden bei  $+925/920\text{ cm}^{-1}$  genauer dargestellt wird. Die Mutante scheint bereits auf die Entstehung des ersten Intermediats einen großen Einfluss auszuüben. Daher sind Differenzen in den Intensitäten nur sehr vorsichtig als solche zu behandeln und die einzig plausiblen Unterschiede, die ausgewertet und diskutiert werden können, jene, die auf einer Bandenverschiebung oder der Präsenz/Absenz einer



**Abbildung 3.5: Tyrosin-Mutanten unter Batho-Bedingungen (80K)**

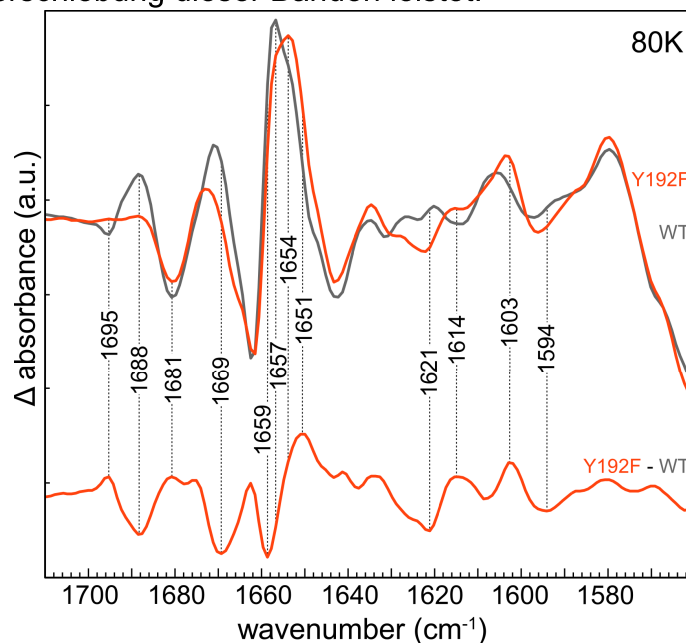
**a)** Spektrum der Y191F-Mutante (grüne Kurve) überlagert mit wt-Bathospektrum (graue Kurve in **a-c**). Der Bereich zwischen 1526 und 1422  $1/\text{cm}$  ist zur besseren Übersicht dreifach vergrößert dargestellt, wobei das Spektrum der Y191F-Mutante und das dd-Spektrum rot und das wt-Spektrum blau markiert sind. **b)** Spektrum der Y192F-Mutante (orange Kurve). **c)** Spektrum der Y206F-Mutante (blaue Kurve). **a-c)** Die Doppeldifferenzen haben die gleiche Farbdarstellung wie die Spektren der jeweiligen Mutante

Bande beruhen. Hierzu können eindeutig die  $\text{dd}$ -Banden bei  $-1522$ ,  $+1642$  und  $+1251 \text{ cm}^{-1}$  gezählt werden.

**Die Y192F-Mutante** weist ähnliche Einflüsse in den Amid-I- und Amid-II-Bereichen sowie im Retinalbereich auf wie die Y191F-Mutante (Abbildung 3.5b).

Einige bathotypische Banden sind jedoch vollkommen abwesend, nämlich die positive Bande bei  $+1688\text{ cm}^{-1}$  und die negative Bande bei  $-1249\text{ cm}^{-1}$ . Des Weiteren gibt es eine zusätzliche breite negative Bande mit einem Maximum bei  $-1622\text{ cm}^{-1}$  (im  $_{\text{dd}}$ Spektrum:  $-1621\text{ cm}^{-1}$ ), die im  $_{\text{wt}}$ Spektrum nicht vorhanden ist.

Die vergrößerte Darstellung des Bereichs zwischen 1560 und 1710 Wellenzahlen in Abbildung 3.6 offenbart darüber hinaus weitere Details im Spektrum der Mutante: So fehlt neben der abwesenden positiven Bande bei  $+1688\text{ cm}^{-1}$  auch die kleine negative Bande bei  $-1695\text{ cm}^{-1}$ . Die benachbarten Banden sind weniger intensiv ausgeprägt, was durch  $_{\text{dd}}$ Banden bei  $+1681$  und  $-1669\text{ cm}^{-1}$  dargestellt wird. Weiterhin befindet sich die positive Bande, die normalerweise bei  $+1657\text{ cm}^{-1}$  vorzufinden ist, nun bei  $+1654\text{ cm}^{-1}$ , was durch  $_{\text{dd}}$ Banden bei  $-1659$  und  $+1651\text{ cm}^{-1}$  repräsentiert wird. Eine weitere auffällige Region befindet sich neben der zusätzlichen Schwingung bei  $-1622\text{ cm}^{-1}$ . Hier fehlt zum einen eine Schwingung bei  $-1613\text{ cm}^{-1}$  (im  $_{\text{dd}}$ Spektrum:  $+1614\text{ cm}^{-1}$ ), zum anderen sind rechts davon befindliche Banden im Spektrum der Mutante stärker ausgeprägt und dadurch ebenfalls verschoben. Dies wird dementsprechend durch  $_{\text{dd}}$ Banden bei  $+1603$  und  $-1594\text{ cm}^{-1}$  gezeigt. Es ist durchaus auch möglich, dass das Fehlen der kleinen negativen Bande bei  $-1613\text{ cm}^{-1}$  ebenfalls einen Beitrag zur beschriebenen Verschiebung dieser Banden leistet.



**Abbildung 3.6: 80K-Spektrum der Y192F-Mutante**

Vergrößerte Darstellung des Bereiches zwischen 1710 und 1560 Wellenzahlen aus der Abbildung 3.5b. Y192F- und  $_{\text{dd}}$ -Spektrum in orange, wt-Spektrum als graue Kurve.

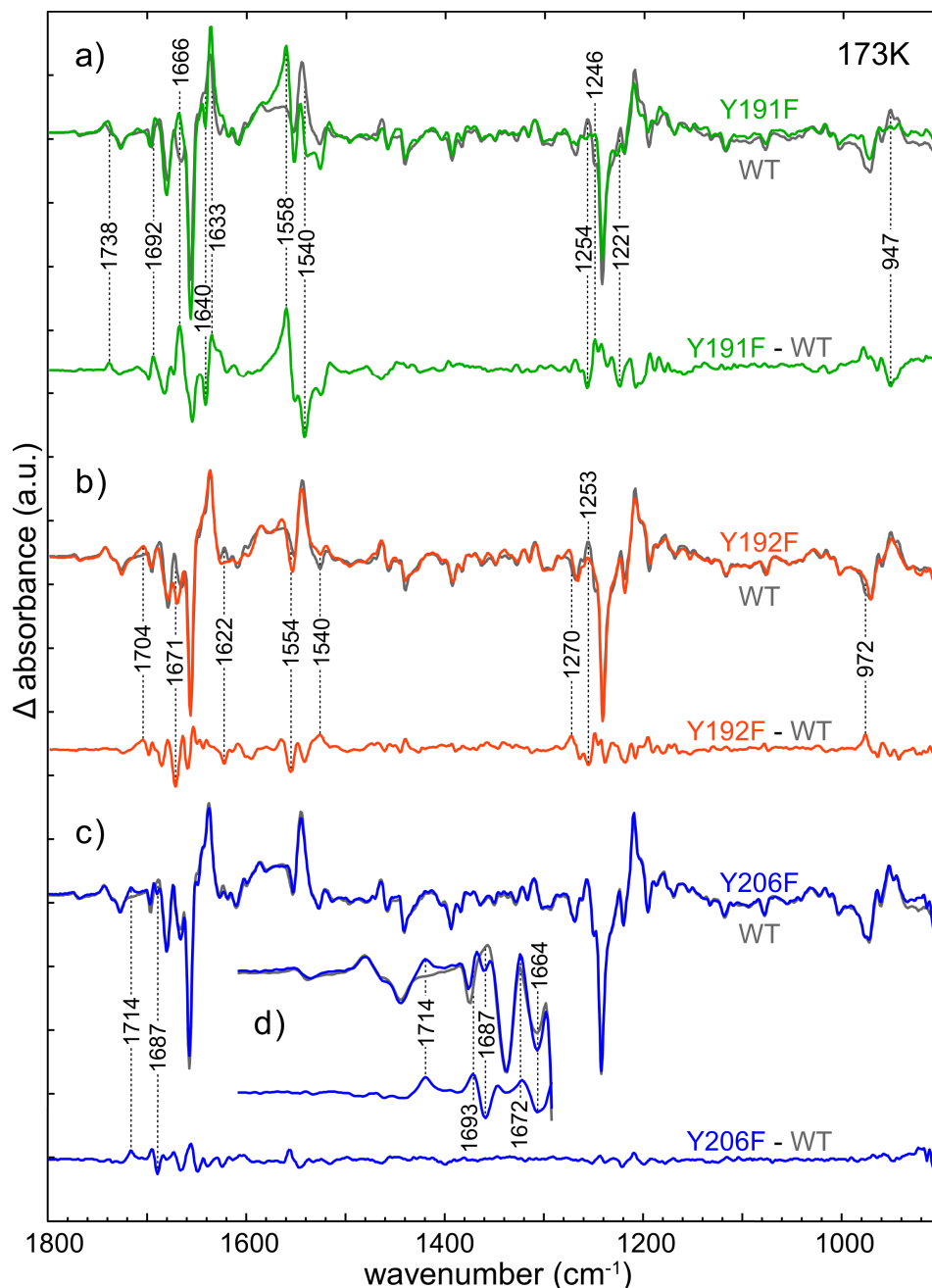
**Y206F-Mutante.** Im Gegensatz zu den beiden zuvor vorgestellten Spektren zeigt das Batho-Spektrum der Y206F-Mutante (Abbildung 3.5c) kaum sichtbare Unterschiede zum  $_{wt}$ -Spektrum. Die dargestellten Spektren sind über den gesamten Bereich nahezu deckungsgleich. Es wird lediglich eine etwas geringere Intensität bei  $^{-1538\text{ cm}^{-1}}$  im Amid-II-Bereich festgestellt, welche nicht als mutationsbedingter Unterschied gedeutet werden kann. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Region, die diese Mutation beherbergt, nämlich das TM3-TM5-Netzwerk, zu diesem Zeitpunkt der Aktivierungskaskade noch keine Rolle spielt.

### 3.2.2 Lumirhodopsin

**Y191F-Mutante.** Die Analyse des Dunkelzustand  $\rightarrow$  Lumi-Übergangs der Y191F-Mutante, dargestellt in Abbildung 3.7a, gestaltet sich deutlich komplizierter. Neben den im Batho-Spektrum bereits beschriebenen Bereichen tritt zusätzlich eine  $_{dd}$ -Bande bei  $^{+1738\text{ cm}^{-1}}$  im Bereich der Carboxylschwingungen auf. Wie im  $_{dd}$ -Spektrum ersichtlich, sind die übrigen Unterschiede deutlich größer und signifikanter geworden. Das Areal der Amid-II-Schwingungen ist dabei am stärksten betroffen. Die zahlreichen Positions- und Intensitätsunterschiede zwischen  $1600\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$  werden durch  $_{dd}$ -Banden bei  $^{+1558\text{ cm}^{-1}}$  und  $^{-1540\text{ cm}^{-1}}$  dargestellt. Die breite Bande bei  $^{+1558\text{ cm}^{-1}}$  ist dabei das auffälligste Merkmal des  $_{dd}$ -Spektrums und fällt genau in den Bereich ( $1556\text{--}1560\text{ cm}^{-1}$ ) der asymmetrischen Streckschwingungen der deprotonierten Carboxylgruppe einer Glutaminsäure [134]. Den Tyrosinschwingungen werden die positive  $_{dd}$ -Bande bei  $^{+1246\text{ cm}^{-1}}$  und die negative Bande  $^{-1254\text{ cm}^{-1}}$  zugeordnet [134, 135]. Die zahlreichen Banden im Amid-I-Bereich sind aus den bereits erwähnten Gründen deutlich schwerer zugänglich. Die  $_{dd}$ -Banden bei  $^{+1633}$  und  $^{-1221\text{ cm}^{-1}}$  können derselben Seitenkette zugehörig sein und demnach korrespondieren. Im Bereich dieser Wellenzahlen befinden sich Histidin-Schwingungen [134]. Auffällig ist zudem, dass die positiven Banden in der HOOP-Region sehr schwach ausgeprägt sind, was die negative  $_{dd}$ -Bande bei  $^{-947\text{ cm}^{-1}}$  hervorruft.

**Y192F-Mutante.** Der Einfluss der fehlenden OH-Gruppe an Position 192 auf das Lumi-Intermediat bzw. den Übergang vom Dunkelzustand des Rezeptors in den Lumi-Zustand wird in Abbildung 3.7b dargestellt. Das Spektrum der Mutante weist alle Eigenschaften des Lumi-Intermediats auf. Es existieren jedoch ähnlich wie beim Batho-Intermediat dieser Mutante gewisse Abweichun-

gen vom Spektrum des Wildtyps. Die  $\Delta$ -Banden im *fingerprint*-Bereich des Retinals ähneln sehr stark den  $\Delta$ -Banden der Y191F-Mutante (Abbildung 3.7a) und repräsentieren im Prinzip den direkten Einfluss der Mutation an Position 192 auf die Bindungstasche und das Retinal im Dunkel- und im Lumi-Zustand (Abbildung 3.8c). In den Amid-I- und Amid-II-Bereichen sind deutlich mehr

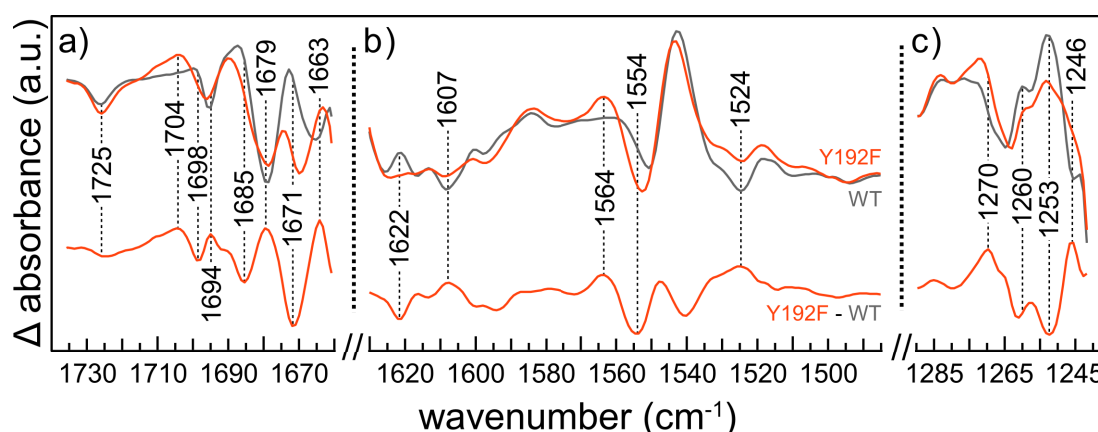


**Abbildung 3.7: Tyrosin-Mutanten unter Lumi-Bedingungen (173K)**

**a)** Spektrum der Y191F-Mutante (grüne Kurve) überlagert mit wt-Lumispektrum (graue Kurve in **a-d**). **b)** Spektrum der Y192F-Mutante (orange Kurve). **c)** **d)** Spektrum der Y206F-Mutante (blaue Kurve). **d)** Der Bereich zwischen 1800 und 1658  $1/\text{cm}$  ist zur besseren Übersicht zweifach vergrößert und gestreckt dargestellt.

Unterschiede zwischen dem Wildtyp- und dem Mutantenspektrum feststellbar. Diese Unterschiede beruhen teilweise auf verschiedenen Intensitäten der Banden, werden aber auch durch das Fehlen einiger Schwingungen verursacht. Ein Beispiel hierfür ist das Fehlen der kleinen positiven Bande bei  $+1622\text{ cm}^{-1}$  (negativ im  $_{dd}$ Spektrum). Diese Position hat bereits beim Batho-Intermediat dieser Mutante besondere Beachtung gefunden und wird dementsprechend im späterem Verlauf dieser Arbeit diskutiert werden.

Die erwähnten Bereiche mit den nachfolgend beschriebenen Banden sind zwecks besserer Übersichtlichkeit in Abbildung 3.8 vergrößert dargestellt. Im Bereich um  $1670\text{ cm}^{-1}$  sind zahlreiche Intensitätsunterschiede und Verschiebungen der Bandenlagen vorzufinden, die besonders gut im  $_{dd}$ Spektrum sichtbar werden (Abbildung 3.8a). Diese rufen die starke negative  $_{dd}$ Bande bei  $-1671\text{ cm}^{-1}$  sowie die positiven  $_{dd}$ Banden bei  $+1679$  und  $+1663\text{ cm}^{-1}$  im  $_{dd}$ Spektrum hervor. In der Region zwischen  $1760$  und  $1650\text{ cm}^{-1}$  absorbieren die meisten protonierbaren und polaren Gruppen, wobei die hier beobachteten Schwin-



**Abbildung 3.8:** 173K-Spektrum der Y192F-Mutante

Vergrößerte Darstellung der Y192F-Mutante (orange Kurve, a-c)) in Überlagerung mit wt-Luminespektrum (graue Kurve, a-c)) aus der Abbildung 3.7b. **a)** Ausschnitt zwischen  $1735$ - $1660\text{ 1/cm}$ . **b)** Ausschnitt zwischen  $1630$ - $1485\text{ 1/cm}$ . **c)** Ausschnitt zwischen  $1290$ - $1242\text{ 1/cm}$ .

gungen besonders starke Extinktionskoeffizienten haben [134]. Das heißt, dass hier Veränderungen in Struktur und Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen abgebildet werden [155]. Die negative  $_{wt}$ Bande bei  $-1551\text{ cm}^{-1}$  ist im Spektrum der Mutante intensiver und geringfügig verschoben, was in einer negativen Bande bei  $-1554\text{ cm}^{-1}$  im  $_{dd}$ Spektrum resultiert (Abbildung 3.8b). In direkter Nachbarschaft zu dieser Bande befindet sich dagegen im Spektrum der Mutante eine weniger intensive Bande bei  $1524\text{ cm}^{-1}$ .

Die beobachteten Unterschiede bedeuten daher, dass sich das Fehlen der Hydroxylgruppe am Aromaten 192 insgesamt auf das sich um das Retinal herum befindende Wasserstoffbrückennetzwerk auswirkt und dieses Netzwerk sowohl im Grundzustand als auch beim Übergang in das jeweilige Intermediat moduliert.

**Y206F-Mutante.** Das Spektrum des Übergangs zum Lumi-Intermediat der Y206F-Mutante weist nur wenige Unterschiede zum Wildtyp auf (Abbildung 3.7c). Die beobachteten Differenzen sind relativ schwach ausgeprägt. Interessant ist jedoch, dass sich hier die ersten Einflüsse der Substitution des Tyrosins durch das Phenylalanin an Position 206 abzeichnen, während das Batho-Spektrum dieser Mutante keine Unterschiede zum  $_{wt}$ Spektrum gezeigt hat. Ein besonderes Augenmerk wird auf den Bereich zwischen 1800 und 1658  $\text{cm}^{-1}$  gelegt, der in Abbildung 3.7d zur besseren Übersicht vergrößert dargestellt ist. Die aus mehreren Einzelkomponenten bestehende  $_{wt}$ Bande hat ihr Maximum bei  $+1686 \text{ cm}^{-1}$ . Im Spektrum der Mutante fehlt mindestens eine Komponente, was zur Folge hat, dass zwei Maxima bei  $+1691$  und  $+1685 \text{ cm}^{-1}$  entstehen und im  $_{dd}$ Spektrum die dazugehörigen  $_{dd}$ Banden bei  $+1693/1687 \text{ cm}^{-1}$  beobachtet werden können. Außerdem zeigt das  $_{wt}$ Spektrum eine zusätzliche positive Bande im Bereich der Carboxylschwingungen bei  $+1714 \text{ cm}^{-1}$ . Die Banden bei  $+1672$  und  $-1664 \text{ cm}^{-1}$  sind intensiver als die entsprechenden Banden im  $_{wt}$ Spektrum.

### 3.2.3 Metarhodopsin I

Im Meta I lassen sich zahlreiche Abweichungen zwischen den Übergangsspektren der Y192F- und Y206F-Mutante und dem Wildtyp-Spektrum über den gesamten spektralen Bereich beobachten. Erwartungsgemäß sind diese Differenzen in den Amid-I- und Amid-II-Bereichen am größten, aber auch die *finger-print*- und die HOOP-Region des Retinals weisen eindeutige Verschiebungen bzw. Intensitätsänderungen der Differenzbanden auf. Die  $_{dd}$ Spektren (vgl. Abbildung 3.9) haben neben vielen Gemeinsamkeiten auch einige qualitative Unterschiede, die im Einzelnen beschrieben werden sollen.

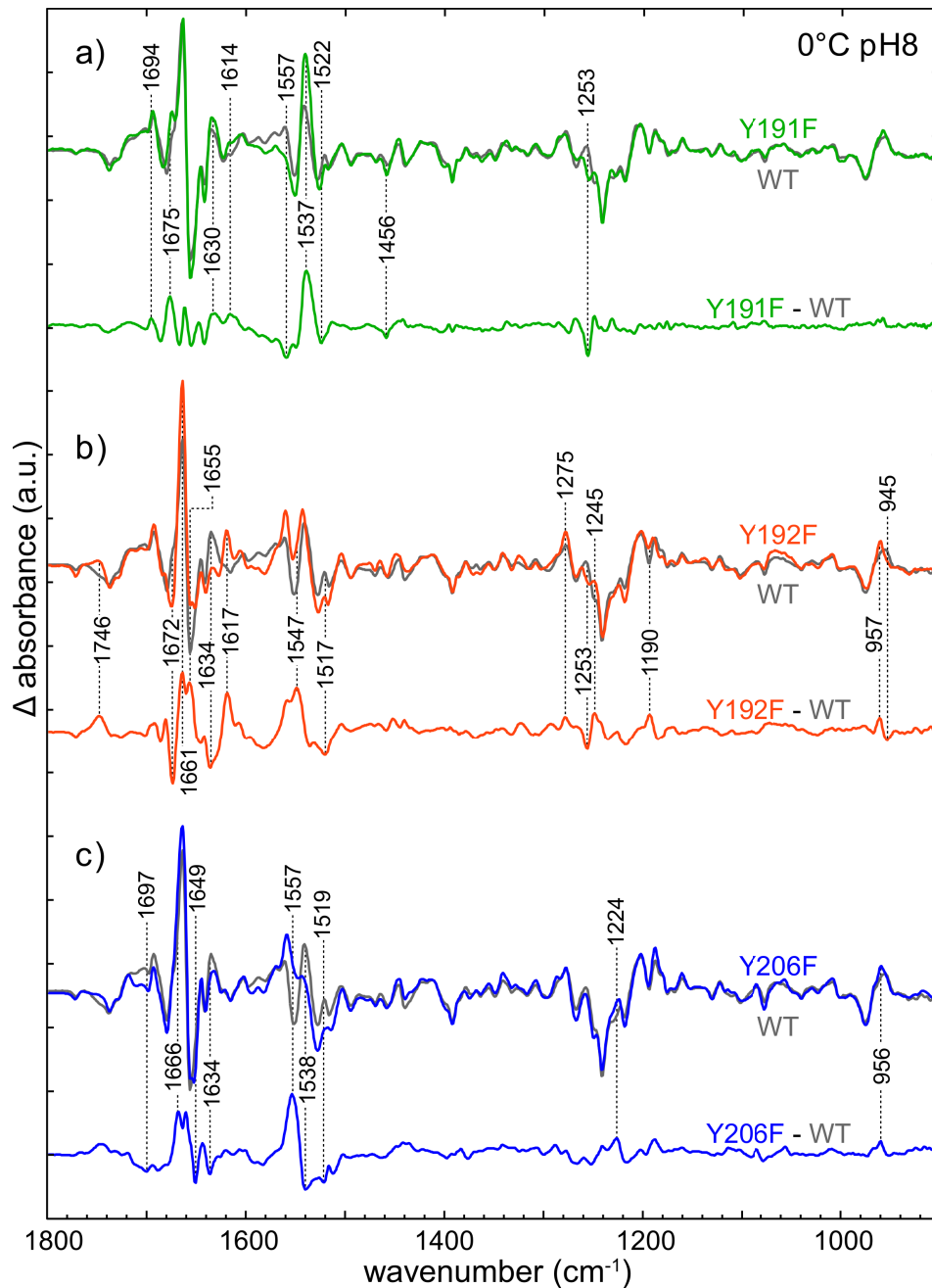
**Y191F-Mutante.** Die Substitution des Tyrosins an Position 191 mit Phenylalanin verlagert das Meta I / Meta II-Gleichgewicht auf die Seite des Meta I-Intermediats. Um jeglichen residualen Einfluss von Meta II auszuschließen (4-5%



Meta II bei pH8, 0°C [156]) wird das Spektrum der Y191F-Mutante mit dem entsprechenden  $_{wt}$ Spektrum bei 253K (<1% Meta II) verglichen. Diese residualen Meta II-Anteile wirken sich insbesondere auf die Ausprägung der Banden im Amid-I-Bereich aus und mindern z.B. die Intensität der Meta I-Markerbande bei  $+1661\text{ cm}^{-1}$ . Auf diesen geringen Anteilen beruht die Anwendung des Extra-Meta II-Assays (siehe Abschnitt 2.2.7). Bemerkenswert ist jedoch, dass bei der vorliegenden Mutante diese Methode fehlschlägt und kein peptidinduziertes Meta II gebildet wird (Daten nicht gezeigt).

Es lassen sich hier einige Verschiebungen der Bandenlagen beobachten (Abbildung 3.9a). Diese Einflüsse rufen die zahlreichen alternierenden Banden zwischen  $1694$  und  $1614\text{ cm}^{-1}$  im  $_{dd}$ Spektrum hervor. Das prominenteste Merkmal der Doppeldifferenz ist aber die positive Bande bei  $+1537\text{ cm}^{-1}$ , die auf die deutlich intensivere Bande bei  $+1538\text{ cm}^{-1}$  im Übergangsspektrum der Mutante zurückzuführen ist. Im weiteren Verlauf, zu niedrigeren Wellenzahlen hin, befinden sich weitere nennenswerte Unterschiede im *fingerprint*-Bereich des Retinals und der Region, die gegenüber den Streckschwingungen der Tyrosinseitenketten sensitiv ist ( $1270$ - $1235\text{ cm}^{-1}$ ) [134]. Hier ist insbesondere die negative  $_{dd}$ Bande bei  $-1253\text{ cm}^{-1}$  hervorzuheben. Diese beruht auf der geringeren Intensität und der Verschiebung der entsprechenden Bande im Übergangsspektrum der Mutante.

**Y192F-Mutante.** Die Unterschiede zum  $_{wt}$ Spektrum, die bereits bei den beiden zuvor betrachteten Intermediaten dieser Mutante beobachtet worden sind, sind bei der letzten inaktiven Spezies sehr stark ausgeprägt (Abbildung 3.9b). Im Bereich der Carboxylschwingungen wird eine breite positive  $_{dd}$ Bande bei  $+1746\text{ cm}^{-1}$  festgestellt. Der Amid-I-Bereich ist besonders bemerkenswert: Einerseits fehlen im Spektrum der Mutante die negative Bande bei  $-1655\text{ cm}^{-1}$  und die positive Bande bei  $+1634\text{ cm}^{-1}$ , andererseits gibt es dafür einige Schwingungen, die sich im  $_{wt}$ Spektrum hingegen nicht beobachten lassen. Es handelt sich um die stärker ausgeprägte negative Bande bei  $-1672\text{ cm}^{-1}$ , die Meta I-Markerbande bei  $+1661\text{ cm}^{-1}$ , sowie eine zusätzliche Schwingung bei  $+1617\text{ cm}^{-1}$ . Im Einklang mit den beschriebenen Differenzen stehen auch die Abweichungen im Amid-II-Bereich. Hier befinden sich zwischen  $1600$  und  $1500\text{ cm}^{-1}$  zahlreiche Banden, die im Spektrum der Mutante deutlich intensiver sind als im  $_{wt}$ Spektrum. Dies führt dementsprechend auch zu den ausgeprägten  $_{dd}$ Banden im



**Abbildung 3.9: Tyrosin-Mutanten unter Meta I-Bedingungen**

**a)** Spektrum der Y191F-Mutante (grüne Kurve) überlagert mit wt-Spektrum (graue Kurve in **a-c**). **b)** Spektrum der Y192F-Mutante (orange Kurve). **c)** Spektrum der Y206F-Mutante (blaue Kurve). **a-c)** Die Doppeldifferenzen haben die gleiche Farbdarstellung wie die Spektren der jeweiligen Mutante.

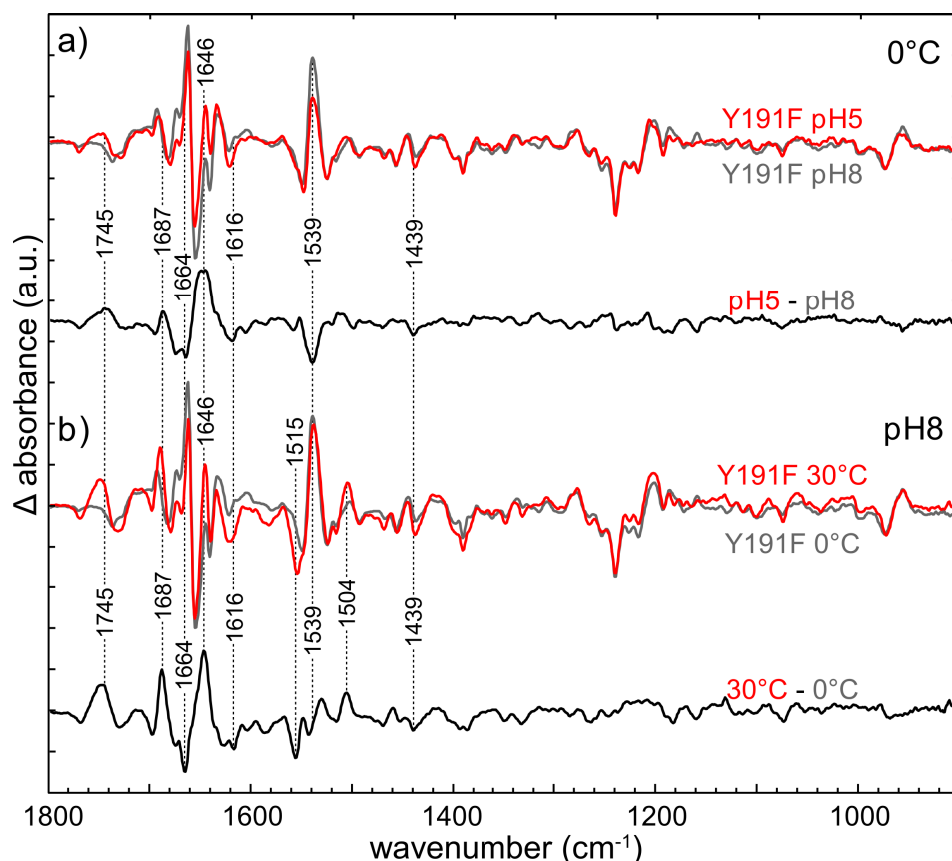
<sup>dd</sup>Spektrum mit den Maxima bei  $+1547$  und  $-1517$   $\text{cm}^{-1}$ . Im Bereich der C-C-, C-O- und C-N-Streckschwingungen lassen ebenfalls einige <sup>dd</sup>Banden bei  $+1275$ ,  $-1253$ ,  $+1245$  und  $+1190$   $\text{cm}^{-1}$  beobachten. In der HOOP-Region finden sich zudem auch <sup>dd</sup>Banden bei  $+957$  und  $-949$   $\text{cm}^{-1}$ .

**Y206F-Mutante.** Die erste erwähnenswerte Differenz (Abbildung 3.9c) liegt im Bereich der Carboxylschwingungen. Das grundsätzliche Muster aus mehre-

ren überlagerten Schwingungen entspricht zwar dem des  $_{wt}$ Spektrums, ist hier aber insgesamt weniger intensiv, was letztendlich eine breite  $_{dd}$ Bande bei  $^{-1697\text{ cm}^{-1}}$  im  $_{dd}$ Spektrum hervorruft. Des Weiteren existieren im Amid-I-Bereich einige Intensitäts- und Positionsunterschiede, die durch  $_{dd}$ Banden bei  $^{+1666}$ ,  $^{-1649}$  und  $^{-1634\text{ cm}^{-1}}$  im  $_{dd}$ Spektrum demonstriert werden. Am stärksten wird aber der Amid-II-Bereich beeinflusst. Hier werden dementsprechend auch die größten Banden im  $_{dd}$ Spektrum beobachtet. Einige Banden werden im Spektrum der Mutante vermisst, was durch  $_{dd}$ Banden bei  $^{+1557\text{ cm}^{-1}}$  und  $^{-1538\text{ cm}^{-1}}$  abgebildet wird. Der Bereich zwischen  $1530$  und  $1500\text{ cm}^{-1}$  ist intensiver als im  $_{wt}$ Spektrum und wird durch die  $_{dd}$ Bande bei  $^{-1519\text{ cm}^{-1}}$  repräsentiert. Es lassen sich zudem geringfügige Abweichungen in retinalabhängigen Bereichen (um  $1224\text{ cm}^{-1}$  und in der HOOP-Region) feststellen.

### 3.2.4 Metarhodopsin II

**Y191F-Mutante.** Die größten Einflüsse durch die Y191F-Mutation werden unter Meta II-Bedingungen sichtbar. Bei  $0^{\circ}\text{C}$  und hoher Protonenkonzentrationen (pH5) bildet sich die aktive Spezies des Rhodopsins Meta II<sub>b</sub>H<sup>+</sup> [156]. Die Substitution des Tyrosins mit Phenylalanin verschiebt das Meta I / Meta II-Gleichgewicht unter diesen Bedingungen komplett auf die Seite des Meta I-Intermediates. Aus diesem Grund ist eine Gegenüberstellung mit dem  $_{wt}$ Basispektrum unter Meta II-favorisierenden Bedingungen nicht sinnvoll. Vielmehr sollen zum einen die beiden Spektren dieser Mutante bei verschiedenen pH-Werten (pH5 und pH8) miteinander verglichen werden (Abbildung 3.10a), um die Einflüsse der hohen Protonenkonzentrationen zu demonstrieren, zum anderen aber soll der Einfluss der Temperatur studiert werden. Dafür werden die Spezies bei verschiedenen Temperaturen ( $0^{\circ}\text{C}$  und  $30^{\circ}\text{C}$ ), aber gleicher Protonenkonzentration (pH8) miteinander verglichen (Abbildung 3.10b). Für beide Vergleiche gilt, dass die offensichtlichsten Differenzen in den Amid-I- und Amid-II-Bereichen festgestellt werden können. Hierzu gehören beispielsweise die  $_{dd}$ Banden bei  $^{+1687}$ ,  $^{-1664}$ ,  $^{+1646}$  und  $^{-1616\text{ cm}^{-1}}$ . Die Regionen, die die retinalabhängigen Änderungen und den Protonierungsstatus der Schiffchen Base abbilden (HOOP und *fingerprint*), bleiben größtenteils nicht betroffen, weder vom niedrigeren pH-Wert, noch von der höheren Temperatur. Des Weiteren wird im Bereich der Carboxylschwingungen eine  $_{dd}$ Bande bei  $^{+1745\text{ cm}^{-1}}$  beob-



**Abbildung 3.10: Temperatur- und pH-Wert-Abhängigkeit der Y191F-Mutante**

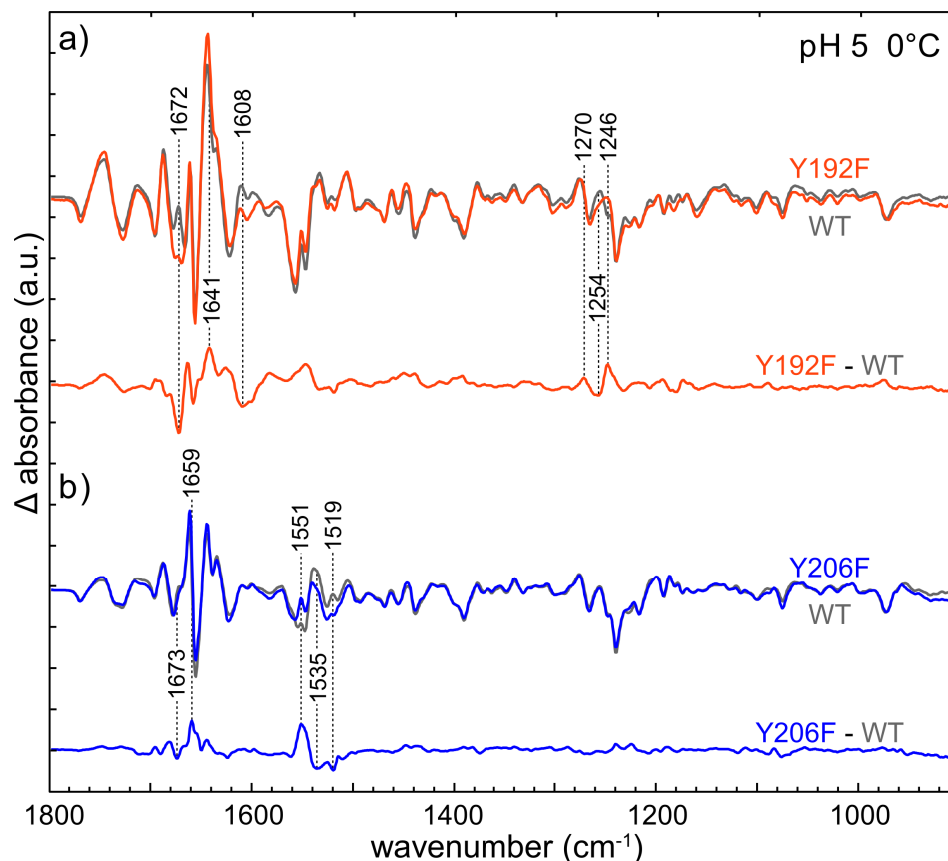
**a)** Überlagerung der Spektren der Y191F-Mutante unter sauren (pH5, 0°C; rote Kurve) und basischen Bedingungen (pH8, 0°C; graue Kurve) **b)** Überlagerung der Spektren der Y191F-Mutante bei verschiedenen Temperaturen (pH8 30°C, rote Kurve; pH8 0°C, graue Kurve) **a-b)** die jeweiligen Doppeldifferenzspektren sind als schwarze Kurve dargestellt.

achtet. In Abbildung 3.10a werden außerdem noch starke Intensitätsunterschiede in der Ausprägung der Meta I-Markerbande bei  $+1539\text{ cm}^{-1}$  festgestellt. Während der pH-Wert einen großen Einfluss auf die Intensität bei  $+1539\text{ cm}^{-1}$  ausübt, scheint diese Bande jedoch wenig von der Temperatur beeinflusst zu sein (Abbildung 3.10b). Des Weiteren existieren hier zwischen den ausgeprägten  $\text{dd}$ Banden bei  $-1515$  und  $+1504\text{ cm}^{-1}$  mehrere Divergenzen.

**Y192F-Mutante.** Die Y192F-Mutante bildet unter den gegebenen Bedingungen die aktive Spezies  $\text{Meta II}_b\text{H}^+$ , jedoch mit einigen Unterschieden zum Wildtyp. Diese Unterschiede werden durch das  $\text{dd}$ Spektrum in Abbildung 3.11a. dargestellt und sind größtenteils in zwei Bereichen des Spektrums konzentriert. Der erste Bereich umfasst zahlreiche  $\text{dd}$ Banden im Bereich der Amid-I-Schwingungen, so z.B. bei  $-1672$ ,  $+1641$  und  $-1608\text{ cm}^{-1}$ . Dabei ist die negative  $\text{dd}$ Bande bei  $-1672\text{ cm}^{-1}$  besonders hervorzuheben. Sie beruht auf einem fehlendem Schwingungsmodus im Spektrum der Mutante bei der gleichen Wellenzahl. Der zweite

Bereich liegt neben der *fingerprint*-Bande des Retinals und beinhaltet die tyrosin- bzw. tyrosinatabhängigen Bandenpositionen bei  $+1270$ ,  $-1254$ ,  $+1246$   $\text{cm}^{-1}$  [134].

**Y206F-Mutante.** Die Substitution des Tyrosins mit Phenylalanin an Position 206 beeinflusst offenbar das Meta I / Meta II-Gleichgewicht. Daher erfolgt an dieser Stelle eine Gegenüberstellung mit der Linearkombination der Meta I- und Meta II-Basispektren (Abbildung 3.11b). Dadurch lässt sich bestimmen, ob diese Verschiebung des Gleichgewichts eine mutationsbedingte Ursache hat, also ob neben der Mischspezies, die sich durch die Linearkombination der beiden Basispektren beschreiben lässt, ein Residuum entsteht ( $_{dd}$ Spektrum), welches diese mutationsbedingten Einflüsse demonstriert. Diese Linearkombination ergibt, dass die Mutante nur zu 82% die aktive Spezies ausbildet, die restlichen 18% also auf der Seite von Meta I liegen. Trotz der Anpassung an die Basispektren bleibt ein Residuum übrig ( $_{dd}$ Spektrum), das sich durch die



**Abbildung 3.11: Y192F- und Y206F-Mutanten unter Meta II-Bedingungen**

**a)** Spektrum der Y192F-Mutante (orange Kurve) überlagert mit wt-Spektrum (graue Kurve). **b)** Spektrum der Y206F-Mutante (blaue Kurve) überlagert mit der Linearkombination (18% Meta I, 0°C, pH8; 82% Meta II, 0°C, pH5) der wt-Spektren (graue Kurve). **a-b)** Die Doppeldifferenzen haben die gleiche Farbdarstellung wie die Spektren der jeweiligen Mutante.

$\delta\delta$ -Banden im Amid-I-Bereich ( $-1673$ ,  $+1659$   $\text{cm}^{-1}$ ), vor allem aber im Amid-II-Bereich ( $+1551$ ,  $-1535$ ,  $-1519$   $\text{cm}^{-1}$ ) auszeichnet.

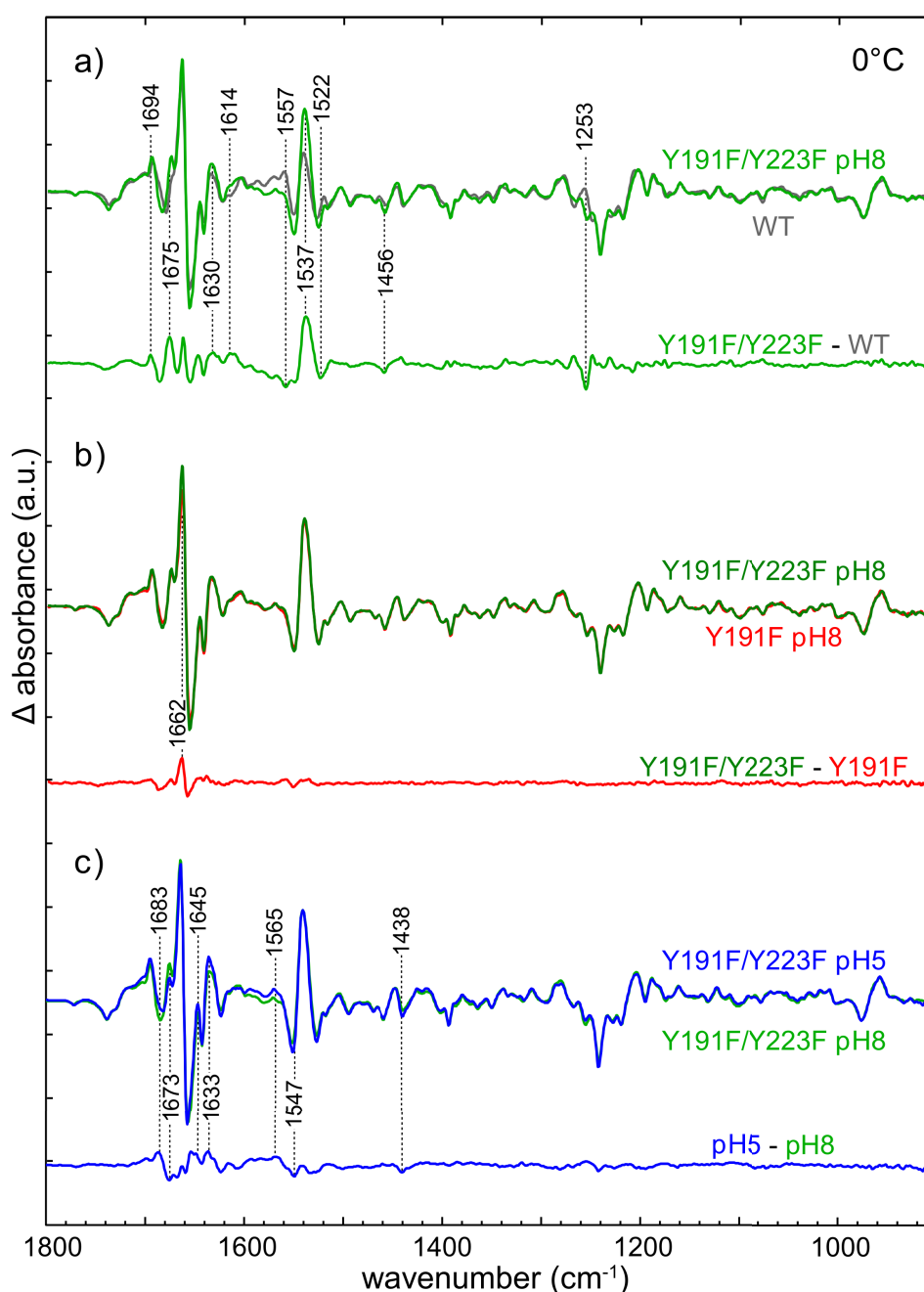
### 3.2.5 Doppelmutante Y191F/Y223F

Als wichtigstes Resultat der eigenen Studie an Tyr223-Mutanten kann die Einwirkung der OH-Gruppe des Tyr223 auf das Meta I / Meta II-Gleichgewicht angesehen werden [7]. Die zuvor beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die Y191F-Mutante dieses Gleichgewicht ebenfalls in Richtung der inaktiven Spezies verlagert. Nun sollte überprüft werden, ob die Einflüsse, die die Einzelmутanten auf das Gleichgewicht haben, sich additiv verhalten und sich somit eine stabile Meta I-Spezies kreieren lässt. Einerseits kann eine ausführliche Studie solcher Mutationen, die derartig starke Einflüsse auf den Aktivierungsmechanismus ausüben, neue Einsichten in die molekular-mechanischen Abläufe einbringen, die mit der Entstehung der aktiven Spezies verbunden sind. Andererseits jedoch kann eine stabile Meta I-Spezies dazu verwendet werden, um die Kristallstruktur dieses Intermediats zu erarbeiten.

Ausgehend von der beschriebenen Zielsetzung beschränkt sich diese Untersuchung auf die Analyse des pH- und temperaturabhängigen Gleichgewichts zwischen Meta I und Meta II. Hierfür wurde die Y191F/Y223F-Doppelmutante sowohl bei  $0^\circ\text{C}$  als auch bei  $30^\circ\text{C}$  gemessen.

**Messungen bei  $0^\circ\text{C}$ .** Das Spektrum der Doppelmutante (Abbildung 3.12a), aufgenommen unter Meta I-favorisierenden Bedingungen, hat offensichtlich große Ähnlichkeit mit dem Meta I-Spektrum der Y191F-Einzelmутante (siehe Abschnitt 3.2.3). Es lassen sich demzufolge die gleichen Abweichungen vom  $\text{wt}$ -Spektrum vorfinden. Deswegen wird an dieser Stelle die detaillierte beschreibende Darstellung der  $\delta\delta$ -Banden ausgespart und auf das entsprechende Kapitel für die Y191F-Einzelmутante verwiesen (siehe Abschnitt 3.2.3). Um diese Aussage zu bekräftigen wurde ein  $\delta\delta$ -Spektrum der Doppelmutante zur Y191F-Einzelmутante errechnet (Abbildung 3.12b). Die Unterschiede sind marginal und spielen sich hauptsächlich im Amid-I-Bereich ab. Dabei könnte es sich natürlich um den Betrag der Y223F-Mutation handeln, da aber dieser Bereich extrem empfindlich gegenüber Proteinkonzentration, Wassergehalt der Probe und ähnlichem ist, kann es sich dabei um eine Abweichung handeln, die zwischen ein-

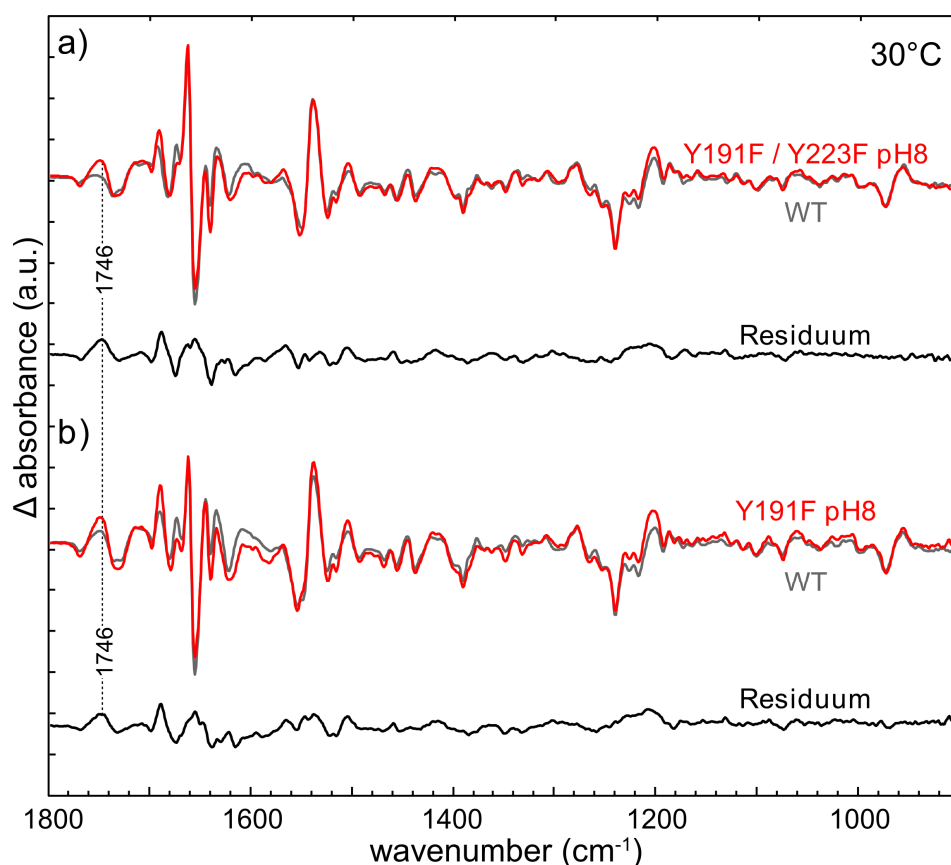
zelenen Messungen auftritt. Aussagekräftiger ist hingegen die Messung, die unter hoher Protonenkonzentration (pH5) durchgeführt worden ist. Es kann schon aus der Differenz der UV-Vis-Spektren (Daten nicht gezeigt), die vor und nach der Belichtung aufgenommen worden sind, abgeleitet werden, dass diese Doppelmutante ( $\lambda_{\text{max}}=480 \text{ nm}$ ) keine deprotonierte Spezies bildet. Insofern ist



**Abbildung 3.12:** Y191F/Y223F - Doppelmutante bei  $0^\circ\text{C}$

**a)** Überlagerung des pH8-Spektrums der Doppelmutante (grüne Kurve in a-c)) mit dem wt-Spektrum (graue Kurve). Doppeldifferenz in grün **b)** Vergleich der pH8-Spektren der Doppelmutante und Y191F-Einzelmutter (rote Kurve). Doppeldifferenz in rot **c)** Y191F/Y223F-Doppelmutante unter sauren (pH5, blaue Kurve) und basischen Bedingungen (pH8, grüne Kurve). dd-Spektrum in blau

auch ein Vergleich mit dem entsprechenden  $_{wt}$ Basisspektrum (pH5, 0°C) nicht sinnvoll. Ein Vergleich mit dem Spektrum indes, welches bei gleicher Temperatur, jedoch unter basischen Bedingungen (pH8) aufgenommen worden ist, gibt Aufschluss darüber, welche Spezies letztendlich entsteht. Diese Überlagerung (Abbildung 3.12c) zeigt, dass die sauren Bedingungen nahezu keinen Einfluss auf die gebildete Spezies ausüben. Es lassen sich nur minimale Unterschiede feststellen, wie geringfügig intensivere Meta II-typische Banden bei  $+1645$  und  $1633\text{ cm}^{-1}$  sowie eine Intensitätsminderung der Banden bei  $-1683$  und  $+1672\text{ cm}^{-1}$ . Diese Differenzen können weder dem Zerfall des *ionic locks* noch der Deprotonierung der Schiffchen Base zugeordnet werden (die UV-Vis-Spektren dienen hier als Anhaltspunkt). Das bedeutet, dass das Meta I-Meta II-Gleichgewicht der Y191F/Y223F-Mutante bei 0°C komplett zugunsten des Meta I-Intermediats verschoben ist.



**Abbildung 3.13: Y191F/Y223F - Doppelmutante bei 30°C**

**a)** Überlagerung des pH8-Spektrums der Y191F/Y223F-Doppelmutante (rote Kurve) mit der Linearkombination der Basisspektren (50% Meta I, 50% Meta II) (graue Kurve). Doppeldifferenz (Residuum) in schwarz **b)** Überlagerung des pH8-Spektrums der Y191F-Doppelmutante (rote Kurve) mit der Linearkombination der Basisspektren (24% Meta I, 76% Meta II) (graue Kurve). Doppeldifferenz (Residuum) in schwarz



**Messungen bei 30°C.** Der Einfluss der Temperatur auf die Lage des Meta I / Meta II-Gleichgewichts der Y191F/Y223F-Doppelmutante wird bei 30°C und pH8 untersucht. Wie bereits bei 0°C beobachtet, verlagert diese Mutante das Gleichgewicht auf die Seite des Meta I-Intermediats. Daher erfolgt eine Anpassung des aufgenommenen Spektrum der Mutante an die Linearkombination aus Meta I- und Meta II-Basispektren über gesamten gemessenen Bereich. Diese ergibt, dass im Spektrum der Mutante 50% Meta I und 50% Meta II<sub>b</sub>H<sup>+</sup> enthalten sind (Abbildung 3.13a). Gleichermäßen durchgeführte Kalkulation für den Wildtyp ergibt dagegen nur 12% Meta I und dementsprechend 88% Meta II<sub>b</sub>H<sup>+</sup>. Dies zeigt eine eindeutige Beeinflussung des Gleichgewichts durch die inkorporierten Mutationen. Um den additiven Beitrag der Y223F herauszufinden wurde die besagte Kalkulation auch mit dementsprechenden Spektrum (30°C, pH8) der Y191F-Einzelmutante durchgeführt (Abbildung 3.13b). Mit 24% Meta I und 76% Meta II<sub>b</sub>H<sup>+</sup> zeigt diese Mutante eine deutlich schwächer ausgeprägte Verschiebung des Meta I / Meta II-Gleichgewichts zur Seite des Meta I-Intermediats als die Y191F/Y223F-Doppelmutante.

### 3.2.6 Fazit

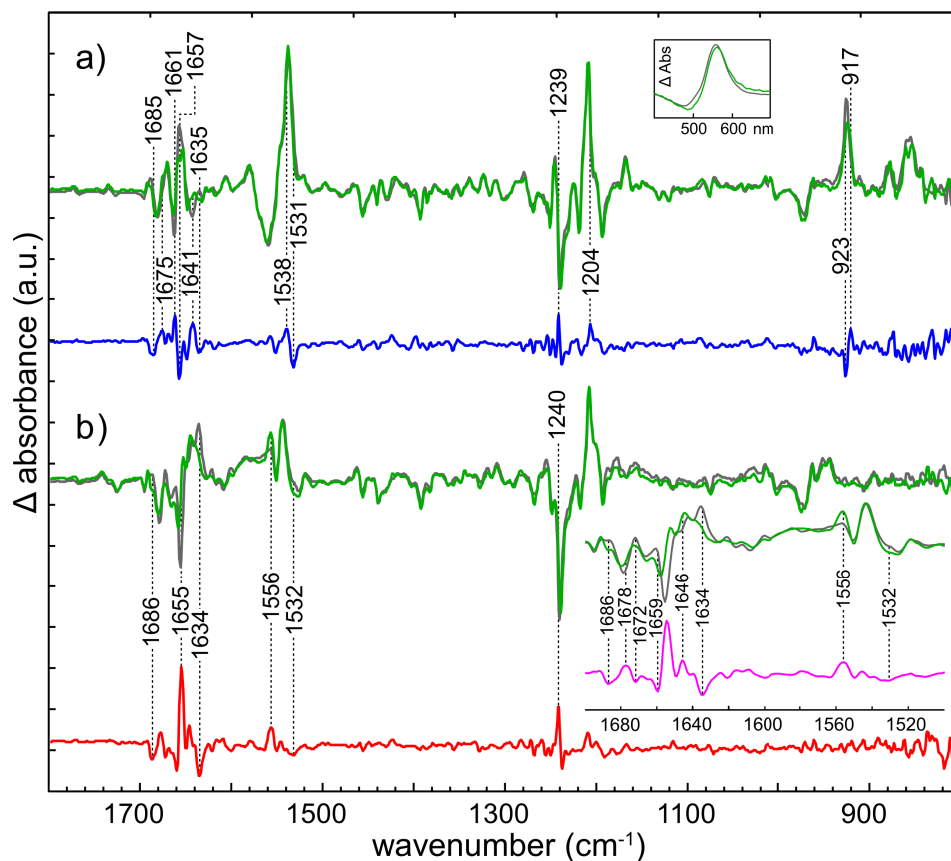
Die Y191F-Mutante wirkt sich sehr stark auf das Meta I / Meta II-Gleichgewicht aus, indem es dieses auf die Seite des Meta I verlagert. Dieser Effekt wird zusammen mit der Y223F-Mutation weiter verstärkt. Die Y206F-Mutante bewirkt ebenfalls eine Verschiebung des Meta I / Meta II-Gleichgewichts. Diese ist jedoch deutlich schwächer und hat auch andere mechanistische Ursachen. Die Y191F- und Y192F-Mutanten beeinflussen sowohl alle Intermediate der Aktivierung als auch den Grundzustand des Rezeptors.

## 3.3 Humanes Rhodopsin

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse zum exprimierten humanen Rhodopsin dargestellt. Da die überwiegende Zahl der bisher veröffentlichten spektroskopischen Studien anhand von bovinem Rhodopsin durchgeführt wurde, werden diese Daten als Referenz herangezogen.

### 3.3.1 Bathorhodopsin

Das Spektrum des Übergangs vom dunkeladaptierten Zustand des humanen Rhodopsins (Abbildung 3.14a) zum Batho-Intermediat zeigt nahezu alle typischen Schwingungsmodi des bovinen Rhodopsins [144]. Die detaillierte Analyse deckt jedoch viele Nuancen auf. Zunächst sind mehrere geringfügige Abweichungen in den Amid-I- und Amid-II-Bereichen erkennbar. Diese werden durch die  $\Delta$ -Banden bei  $-1685$ ,  $+1675$ ,  $+1661$ ,  $-1657$ ,  $+1641$ ,  $-1635$ ,  $+1538$  und  $-1531$   $\text{cm}^{-1}$  dargestellt. Des Weiteren gibt es im *fingerprint*-Bereich des Retinals eine scharfe positive Bande bei  $+1239$   $\text{cm}^{-1}$ , sowie eine Bande bei  $+1204$   $\text{cm}^{-1}$ . Diese 1239er Bande, die u.a. die C-C-Schwingungsmodi des Retinals repräsentiert, ist nicht nur beim Übergang zum Batho-Intermediat ersichtlich, sondern allen Spektren der Aktivierungskaskade des humanen Rhodopsins gemein



**Abbildung 3.14: Batho- und Lumi-Spektren vom humanem Rhodopsin**

**a-b)** humanes Rhodopsin (grüne Kurve), bovines Rhodopsin (graue Kurve) **a)** Überlagerung der Batho-Spektren (80K) vom humanem und bovinem Rhodopsin. Die Doppeldifferenz (human-bovine) ist in blau gezeichnet. Im Inset die dazugehörigen UV-Vis-Differenzspektren. **b)** Überlagerung der Lumi-Spektren (173K) vom humanem und bovinem Rhodopsin. Die Doppeldifferenz ist in rot gezeichnet. Zur besseren Übersicht ist der Bereich zwischen 1700 und 1500 Wellenzahlen gestreckt dargestellt, die Doppeldifferenz ist hierbei rosa.

und lässt sich deshalb dem Grundzustand zuordnen. Sie beruht letztendlich aufgrund der veränderten Umgebung der SB auf der spektralen Verschiebung der *fingerprint*-Bande von  $^{-1238\text{ cm}^{-1}}$  (bovine) zu  $^{-1237\text{ cm}^{-1}}$  (human). Die HOOP-Region, also der Bereich um  $900\text{ cm}^{-1}$  als Abbild der Verdrillung des Retinals, ist ebenfalls in seiner Intensität und Bandenlage betroffen. Diese Unterschiede werden durch die  $\text{dd}$ -Banden bei  $^{-923}$  und  $^{+917\text{ cm}^{-1}}$  visualisiert.

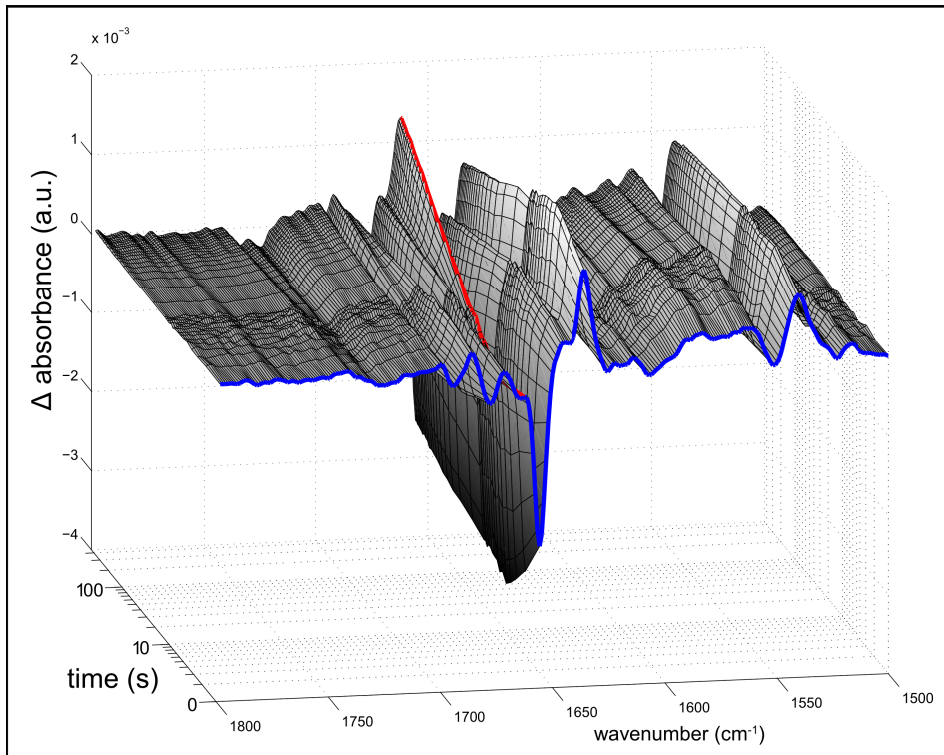
### 3.3.2 Lumirhodopsin

Lumi wird üblicherweise bei 173K stabilisiert und zeichnet sich durch ein dem Grundzustand sehr ähnliches Absorptionsmaximum im visuellen Bereich bei 500 nm aus. Das Übergangsspektrum des humanen Rhodopsins weist vergleichbare Bandenlagen und -intensitäten auf (Abbildung 3.14b). Das  $\text{dd}$ -Spektrum deckt allerdings deutlich größere Abweichungen zwischen den Übergangsspektren der beiden Rhodopsine auf, als dies noch beim Batho-Intermediat der Fall gewesen ist. Der Amid-I-Bereich des humanen Lumi ist insgesamt weniger intensiv und es treten zahlreiche Verschiebungen der Bandenlagen auf, was letztendlich in sehr vielen und stark ausgeprägten  $\text{dd}$ -Banden im  $\text{dd}$ -Spektrum bei  $^{-1686}$ ,  $^{+1655}$  und  $^{-1634\text{ cm}^{-1}}$  resultiert. Der Amid-II-Bereich ist weniger betroffen, hier ist aber die Bande bei  $^{+1556\text{ cm}^{-1}}$  hervorzuheben, die im Falle des humanen Rhodopsins deutlich intensiver ist. Zwecks besserer Übersichtlichkeit sind die Amid-I- und Amid-II-Bereiche (zwischen  $1700$  und  $1500\text{ cm}^{-1}$ ) in Abbildung 3.14b gestreckt dargestellt worden.

Alle anderen spektralen Bereiche, mit Ausnahme der *fingerprint*-Bande bei  $^{+1240\text{ cm}^{-1}}$ , sind weitestgehend nicht betroffen und zeigen daher eine sehr große Übereinstimmung beider Spektren, was durch eine flache Linie im  $\text{dd}$ -Spektrum verdeutlicht wird.

### 3.3.3 Spektren bei $-40^{\circ}\text{C}$

Um den Übergang zum Meta I-Intermediat genauer untersuchen zu können, wurde ein weiteres Experiment bei  $-40^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Hierbei zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Proteinen, die in Abbildung 3.15 am Beispiel des bovinen Rhodopsins ersichtlich werden. Während der humane Rezeptor bei gegebener Temperatur schnell, d.h. Innerhalb der zeitlichen Auflö-



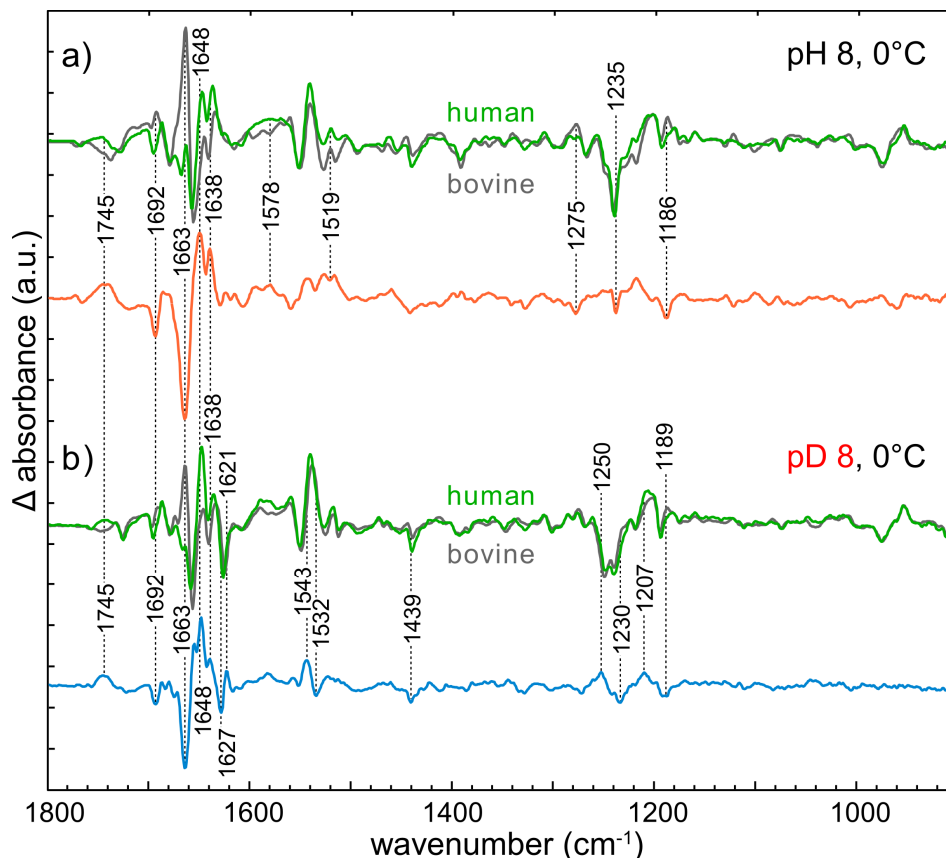
**Abbildung 3.15: Bovines Rhodopsin bei 233K (-40°C)**

Ausschnitt zwischen 1800 und 1500  $1/\text{cm}$  einer *rapid-scan*-Messung vom bovinen Rhodopsin bei 233K. Der zeitliche Verlauf ist logarithmisch angegeben. In *blau* ist ein Spektrum dargestellt, welches dem Lumi-Intermediat entspricht und 3s nach der Belichtung entsteht. In *rot* ist der zeitliche Verlauf der Meta I-Markerbande bei 1661  $1/\text{cm}$  dargestellt.

sung des Experiments ( $<1\text{s}$ ) die Meta I-Spezies bildet (Daten nicht gezeigt), kann man beim bovinen Rezeptor beobachten, wie zunächst das Lumi-Intermediat entsteht und sich daraus innerhalb von ca. 2 Minuten die Meta I-Spezies bildet. Dies kann man anhand der Zeitspuren der für das jeweilige Intermediat typischen Banden feststellen. In Abbildung 3.15 wird der zeitliche Verlauf der Absorptionsänderung im Bereich zwischen 1800 und 1500  $\text{cm}^{-1}$  dargestellt, wobei das Spektrum mit den für das Lumi-Intermediat typischen Banden blau markiert worden ist. Als Beispiel der Entstehung der Meta I-Spezies ist die Intensitätsänderung der Meta I-Markerbande bei 1661  $\text{cm}^{-1}$  rot markiert worden. Neben der erwähnten Markierung lässt sich der Lumi  $\rightarrow$  Meta I-Übergang anhand der zeitlichen Verläufe der Absorptionsänderungen aller für diese Intermediate typischen Banden beobachten.

### 3.3.4 Metarhodopsin I

Das Meta I-Spektrum (pH8, 0°C) des humanen Rhodopsins (Abbildung 3.16a) zeigt im Vergleich mit den Vorgängerintermediaten die größten Abweichungen zum entsprechenden Spektrum des bovinen Rhodopsins. Das betrifft nicht nur die Banden in den Amid-I- und Amid-II-Bereichen, wobei der Amid-I-Bereich besonders ausgeprägte Differenzen aufweist, sondern auch den Bereich der Schwingungen der Carboxylgruppen zwischen 1780 und 1670  $\text{cm}^{-1}$ . So lässt sich hier explizit der Status der Wasserstoffbrückenbindungen von Asp83 und Glu122 beobachten [155]. Den größten Unterschied zwischen den beiden Meta I-Spektren kann man jedoch um 1660  $\text{cm}^{-1}$  feststellen (negative  $\delta\delta$ -Bande bei  $\sim 1663 \text{ cm}^{-1}$ ). Dabei ist eine eindeutige Interpretation dieser Bande derzeit nicht möglich, da hier nicht nur die Amid-I-Schwingungen auftreten, sondern auch Schwingungen des Wassers und zahlreicher Seitenketten [134]. Die



**Abbildung 3.16: Humanes Rhodopsin unter Meta I-Bedingungen**

**a-b)** humanes Rhodopsin (grüne Kurve), bovinen Rhodopsin (graue Kurve) **a)** Überlagerung der Spektren von humanem und bovinem Rhodopsin bei pH8, 0°C. Die Doppeldifferenz der beiden Spektren ist orange. **b)** Überlagerung der deuterierten Spektren vom humanen und bovinen Rhodopsin bei pD8, 0°C. Die Doppeldifferenz ist hellblau.

betreffende Bande fehlt komplett im Meta I-Spektrum des humanem Rhodopsins, stattdessen lassen sich aber zwei zusätzliche Banden bei  $+1648$  und  $+1638\text{ cm}^{-1}$  beobachten. Die letzten beiden Banden sind jedoch auch typisch für den Übergang zu Meta II. Die Banden im *fingerprint*-Bereich des Retinals sind ebenfalls in deutlich höherem Maße als bei den Vorgängerintermediaten betroffen. So lassen sich hier neben den vielen kleinen Differenzen auch klar ausgeprägte  $\text{dd}$ -Banden bei  $-1275$ ,  $-1235$ , und  $-1186\text{ cm}^{-1}$  erkennen. Abgesehen von den beschriebenen Banden kann man weiterhin feststellen dass im gesamten gemessenen Bereich nahezu keine Bande existiert, die nicht in ihrer Position und/oder Intensität betroffen wäre.

Um die unter Meta I-Bedingungen beobachteten Unterschiede genauer analysieren zu können, wurden zwei weitere Strategien angewendet. Dies ist zum einen die Deuterierung der humanen Probe, wobei sich durch den Austausch von  $\text{H}_2\text{O}$  gegen  $^2\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , Deuteriumoxid) u.a. die durch Carbonsäurereste hervorgerufenen Banden von den Vibrationen der nicht protonierbaren Seitenketten bzw. Schwingungen der Lipidumgebung des Rhodopsins unterscheiden lassen. Zum anderen wurden human-bovine-Chimären erzeugt (siehe Abschnitt 3.3.5).

**Messungen in  $^2\text{H}_2\text{O}$ .** Die Darstellung der überlagerten Spektren unter den Meta I-favorisierenden Bedingungen (pD8,  $0^\circ\text{C}$ ) ist in Abbildung 3.16b gegeben. Hier werden ebenfalls wie bei den  $\text{H}_2\text{O}$ -Meta I-Spektren der beiden Proteine große Abweichungen zwischen den Meta I-Intermediaten festgestellt. Neben der großen Anzahl der Bandenpositionen, die durch den Austausch von  $\text{H}_2\text{O}$  gegen  $^2\text{H}_2\text{O}$  betroffen sind, gibt es auch unbeeinflusste Bandenlagen (z.B.  $\text{dd}$ -Banden bei  $+1745$ ,  $-1692$ ,  $-1663$ ,  $+1648$  und  $+1638\text{ cm}^{-1}$ ). Von den Verschiebungen der Bandenlagen ist beispielsweise der *fingerprint*-Bereich des Chromophors sehr stark beeinflusst. Es lässt sich aber auch eine zusätzliche Schwingung feststellen, die zwar bei beiden Proteinen vorkommt, sich aber in Intensität und Position unterscheidet, was zu den  $\text{dd}$ -Banden bei  $-1627$  und  $+1621\text{ cm}^{-1}$  im  $\text{dd}$ -Spektrum führt.

Mithilfe der deuterierten Proben soll jedoch hauptsächlich die Ursache der positiven  $\text{dd}$ -Bande bei  $+1745\text{ cm}^{-1}$ , die in Abbildung 3.16a beobachtet worden ist, geklärt werden. Diese kann entweder durch das TM3-TM5-Netzwerk, also der Kopplung von Glu122 und His211 oder der Lipidumgebung hervorgerufen wer-

den. Aus Abbildung 3.16b lässt sich ableiten, dass diese Bande in ihrer Position vom H/D-Austausch unbeeinflusst wird. Daher kann diese Schwingung nur durch Lipidester hervorgerufen werden [157].

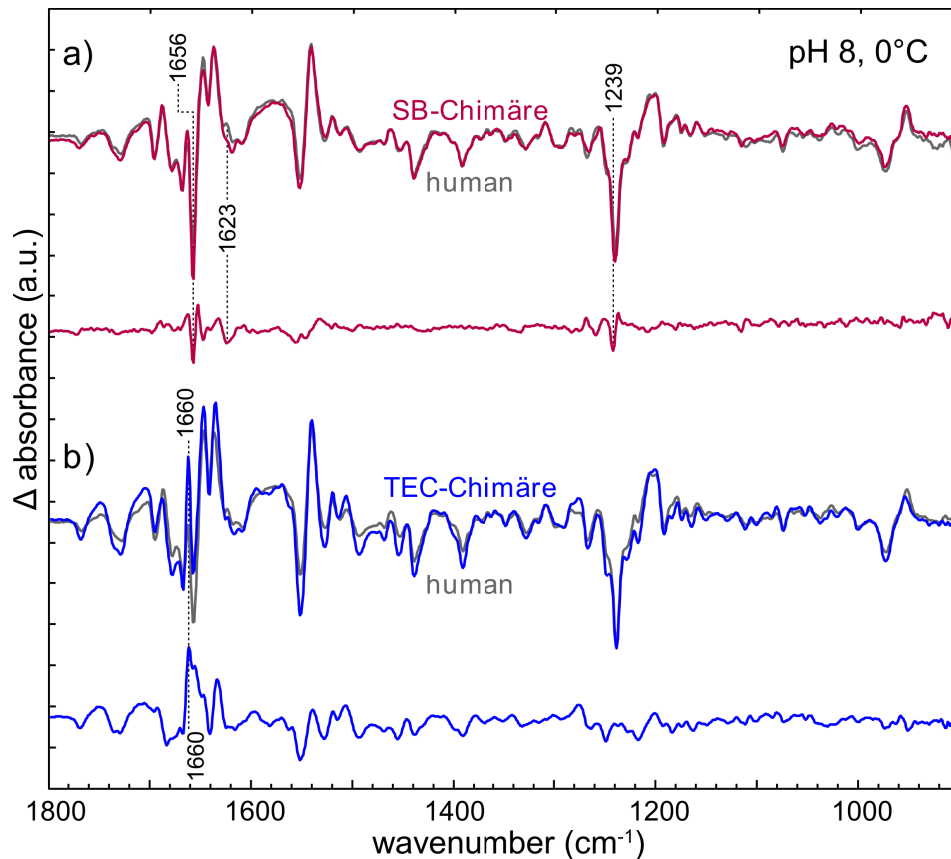
### 3.3.5 Human-bovine-Chimären, Metarhodopsin I

Ausgehend von der Gegenüberstellung der Sequenzen beider Rhodopsine, sind zwei Bereiche größter Diskrepanz (siehe Abschnitt 1.6.1) identifiziert worden. Diese Sequenzabschnitte aus dem bovinen Rhodopsin wurden einzeln in die humane Sequenz integriert. Die auf der Basis des humanen Rhodopsins hergestellten human-bovinen Chimären, wurden ebenfalls unter Bedingungen untersucht, bei denen sich verschiedene Meta II-Spezies stabilisieren lassen. In diese Auswertung sind aber nur jene Messungen (Meta I-Bedingungen) eingeflossen, die eine Analyse der Signalwege unterstützen. Zuerst sind aber die Absorptionsmaxima der dunkeladaptierten Zustände bestimmt worden. Diese werden nachfolgend zusammengefasst.

Pigment	Human WT	Bovine WT	SB-Chimäre	TEC-Chimäre
$\lambda_{\max}$ (nm)	494	498	497	492

**SB-Chimäre.** Der Austausch der SB-Umgebung ( $_{297}\text{SAAI}_{300}$ ) mit der bovinen Sequenz ( $_{297}\text{TSAV}_{300}$ ) übt vergleichsweise wenig Einfluss auf die Entstehung des Meta I-Intermediats aus (Abbildung 3.17a). Es existieren nur einige geringfügige Abweichungen in den Amid-I- und Amid-II-Bereichen. Der wichtigste Befund an dieser Stelle ist jedoch die scharfe positive Bande bei  $+1239\text{ cm}^{-1}$  im  $\text{dd}$ Spektrum. Diese Bande hat ihren Ursprung in der Verschiebung der gekoppelten C-C-, C-N-H-Valenzschwingungen des Retinals von  $-1236\text{ cm}^{-1}$  im humanen Rhodopsin zu  $-1237\text{ cm}^{-1}$  in der Chimäre, also zurück zu der Frequenz, die für bovines Rhodopsin typisch ist.

**TEC-Chimäre.** Der Einbau der  $\text{T}_5\text{E}_2\text{C}$ -Region aus dem bovinen in den humanen Rezeptor hat offensichtlich sehr starke Wirkung auf die Bildung der letzten inaktiven Spezies (Abbildung 3.17b). Es sind große Abweichungen über den gesamten spektralen Bereich feststellbar. Ausgehend von den zahlreichen  $\text{dd}$ Banden im Carboxyl- sowie den Amid-I- und Amid-II-Bereichen, kann insgesamt postuliert werden, dass die strukturellen Änderungen, die diese Chimäre beim Übergang zum Meta I-Intermediat erfährt, signifikant größer sind als im



**Abbildung 3.17: Human-Bovine-Chimären unter Meta I-Bedingungen**

**a-b)** humanes Rhodopsin als Referenz (graue Kurve) unter Meta I-stabilisierenden Bedingungen (pH8, 0°C). **a)** SB-Chimäre (dunkelrote Kurve). Austausch der Region zwischen der Schiffschen Base und dem NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motiv (aa 297-300) im humanen Rezeptor mit der bovinen Sequenz. **b)** TEC-Chimäre (blaue Kurve). Austausch der Übergangsregion von der TM5 in den EL2 (aa 194-196) im humanem Rezeptor mit der bovinen Sequenz. **a-b)** Die Doppeldifferenzen sind in der gleichen Farbe wie die Spektren der Chimären abgebildet.

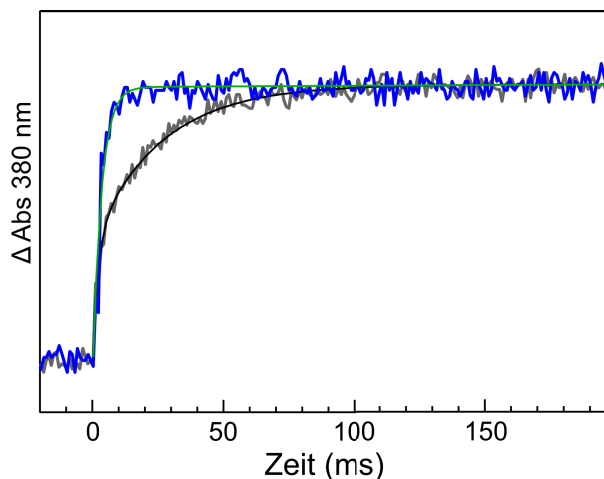
humanen Rhodopsin. Bemerkenswert ist, dass die Meta I-Markerbande des bovinen Rhodopsins bei  $\sim 1661 \text{ cm}^{-1}$  teilweise wiederhergestellt wird, des Weiteren befindet sich die *fingerprint*-Bande ( $1237 \text{ cm}^{-1}$ ) des Retinals an der gleichen Position wie im humanen Wildtyp. Die Ausprägung dieser Meta I-Markerbande liegt bei ca. 40% der im bovinem Rhodopsin üblichen Intensität.

### 3.3.6 Blitzlichtphotolyse

Die Blitzlichtphotolyse wurde verwendet, um die Entstehung der aktiven Spezies zeitaufgelöst verfolgen zu können. Dafür wurden die stark verdünnten Proben ( $0,1 \text{ }\mu\text{M}$ ) beider Spezies mit kurzen Laserblitzen (ca. 6 ns) bei 532 nm belichtet und die Absorption bei 380 nm mit einer zeitlichen Auflösung von 1 ms aufgenommen (Abbildung 3.18). Die Absorption bei dieser Wellenlänge ist ein



Marker für die Entstehung der deprotonierten Spezies. Das heißt, dass es sich hierbei entweder um die Meta II- oder die Meta I<sub>380</sub>-Spezies handelt [158]. Die Kinetik des bovinen Rhodopsins zeigt ein ausgeprägtes biphasisches Verhalten mit 55% der schnellen und 45% der langsamen Komponente und den entsprechenden Raten bei 510 s<sup>-1</sup> und 38 s<sup>-1</sup>. Diese Werte sind in einer guten Übereinstimmung mit bereits publizierten Ergebnissen [159]. Die Entstehung der deprotonierten Spezies beim humanen Rhodopsin folgt dagegen fast ausschließlich dem schnellen Pfad (92%). Die Raten betragen hierbei 480 s<sup>-1</sup> und 65 s<sup>-1</sup> für die langsame Komponente.



**Abbildung 3.18: Blitzlichtphotolyse**

humanes Rhodopsin (gemessene Daten, *blau*; Fit, *grün*); bovinen Rhodopsin (gemessene Daten, *grau*; Fit, *schwarz*)

### 3.3.7 Meta I – Meta II-Übergang

Der Übergang zwischen der inaktiven und der aktiven Spezies geht mit einer Protonenaufnahme einher, welche abhängig von Temperatur und pH-Wert ist. Durch pH-abhängige Messungen bei einer gegebenen Temperatur lässt sich die dazugehörige Gleichgewichtskonstante (pKa-Wert) dieser Reaktion bestimmen. Hierfür wurden bei 20°C für beide Pigmente FTIR-Differenzspektren bei unterschiedlichen pH-Werten aufgenommen (pH-Bereich zwischen 4,4 und 8,0 in ungefähr äquidistanten Schritten) und normiert. Von diesen Differenzspektren  $\Delta(\text{pH})$  wurde jeweils ein gleichermaßen normiertes Dunkelzustand  $\rightarrow$  Meta I-Referenzspektrum  $\Delta(\text{MI})$  (-20°C, pH 8) abgezogen, um ausschließlich Differenzbanden analysieren zu können, die im Zusammenhang mit dem Meta I  $\rightarrow$  Meta II-Übergang stehen.

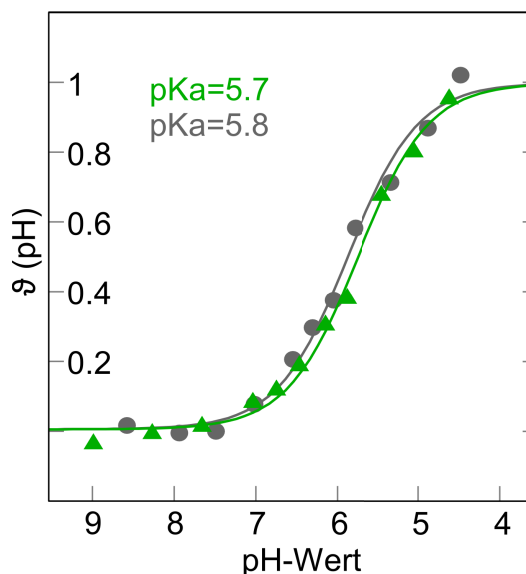
$$\vartheta(\text{pH}) = \Delta(\text{pH}) - \Delta(\text{MI})$$

Die Bestimmung des pKa-Wertes wurde anhand der Meta II-charakteristischen Differenzbande bei  $+1744 \text{ cm}^{-1}$  bestimmt. Beide Pigmente besitzen an dieser Stelle unterschiedliche Intensitäten (siehe Abbildung 3.16) in ihren Meta I-Spektren, was zu einem abweichenden Maximalwert  $\vartheta$  führt. Um diesem

Unterschied Rechnung tragen zu können, wurde  $\vartheta(\text{pH})$  zunächst an eine reguläre Henderson-Hasselbalch-Gleichung mit einem zusätzlichen pigment-spezifischen-Vorfaktor  $A$  angepasst.

$$\vartheta_{1744}(\text{pH}) = A \frac{10^{\text{pKa} - \text{pH}}}{1 + 10^{\text{pKa} - \text{pH}}}$$

Zur Darstellung des Anteils an aktiver Spezies wurden im Nachhinein beide pH-Reihen und die dazugehörigen Modellkurven der Intensität bei  $1744 \text{ cm}^{-1}$  durch den jeweiligen Vorfaktor  $A$  geteilt (Abbildung 3.19) [24, 160]. Die Kurvenanpassungen ergeben nahezu gleiche pKa-Werte für beide untersuchten Rezeptoren. Für das humane Rhodopsin liegt der Wert bei 5,7, im Falle des bovinen Rezeptors bei 5,8.



**Abbildung 3.19: pH-Titration bei 20°C**

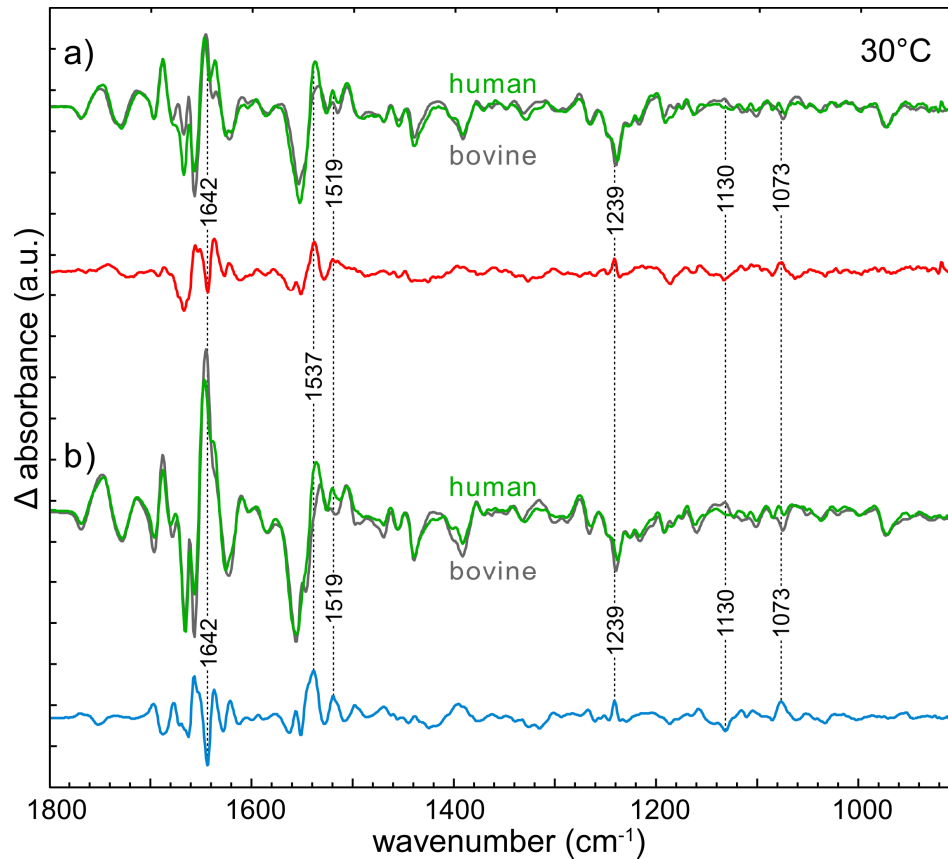
Absorptionsänderungen der Bande bei  $1744 \text{ 1/cm}$  (human, *grüne* Dreiecke; bovine, *graue* Punkte) in Abhängigkeit vom pH-Wert. Anschließend Kurvenanpassung an Henderson-Hasselbalch-Funktion (human, *grüne* Kurve; bovine, *graue* Kurve).

### 3.3.8 Metarhodopsin II

Abbildung 3.20 zeigt die Meta II-Spektren des humanen Rhodopsins in der Überlagerung mit den entsprechenden Spektren des bovinen Rhodopsins. Nicht nur das gleiche Absorptionsmaximum im UV-visuellen Bereich, sondern auch Bandenposition und -intensitäten belegen, dass der humane Rezeptor eine aktive Spezies ausbildet, die dem bovinen Analogon sehr ähnlich ist. So lassen sich auch hier die bekannten Meta II-Markerbanden bei  $-1768$ ,  $+1746$ ,  $+1644$  und  $+1532 \text{ cm}^{-1}$  vorfinden. Die verhältnismäßig kleinen  $\text{dd}$ -Banden deuten daraufhin, dass sich die beiden Spezies nur geringfügig unterscheiden.

Die wichtigste Prämisse für die Bildung der Bindungsstelle an der cytoplasmatischen Seite des Rezeptors ist die Aufnahme eines Protons am *ionic lock* und der damit verbundene Zerfall dieser ionischen Kopplung. Dieser Vorgang kann spektroskopisch mithilfe der positiven Bande bei  $+1644 \text{ cm}^{-1}$  begleitet werden. Die dazugehörige Bande befindet sich beim humanen Rhodopsin aller-

dings bei  $+1646\text{ cm}^{-1}$ , was eine  $_{dd}$ Bande bei  $-1646\text{ cm}^{-1}$  hervorruft. Die Doppeldifferenz hat aber nahezu deckungsgleiche Übereinstimmungen mit dem  $_{dd}$ Spektrum des Vorgängerintermediats.

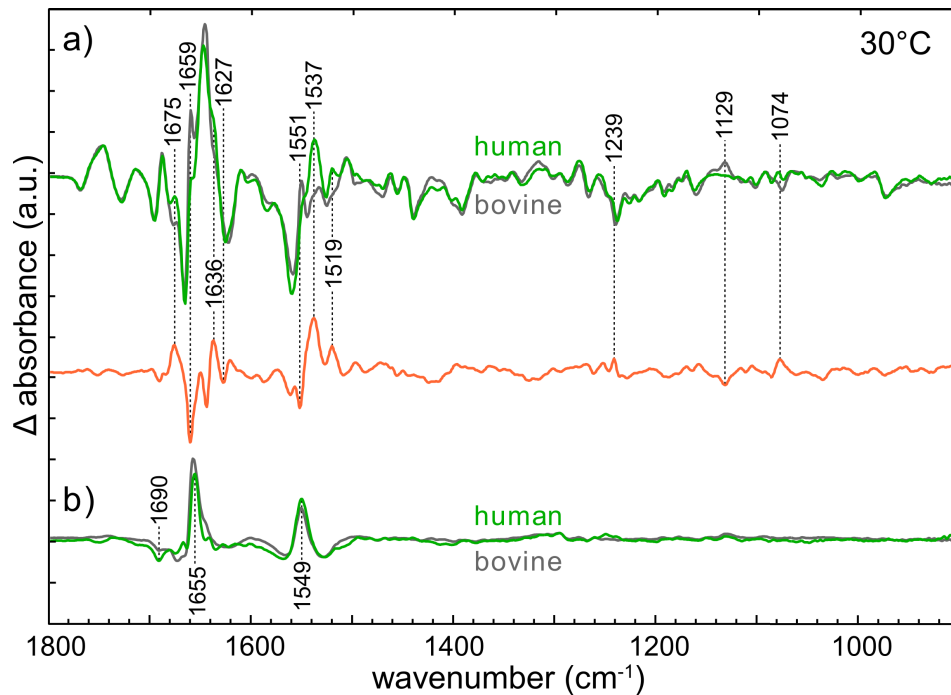


**Abbildung 3.20: Humanes Rhodopsin unter Meta II-Bedingungen**

**a-b)** humanes Rhodopsin (grüne Kurve), bovines Rhodopsin (graue Kurve) **a)** Überlagerung der Spektren von humanem und bovinem Rhodopsin bei pH8, 30°C. Die Doppeldifferenz der beiden Spektren ist rot. **b)** Überlagerung der Spektren vom humanen und bovinen Rhodopsin bei pH5, 30°C. Die Doppeldifferenz ist hellblau.

### 3.3.9 Meta II<sub>c</sub> und pbs

Die aktive Spezies des Rezeptors überträgt den Reiz auf zellinterne biochemische Signalwege durch die Komplexbildung mit dem G-Protein. Um die zugrunde liegenden Mechanismen untersuchen zu können, wird ein aus dem C-terminalen Ende der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins stammendes, 11 Aminosäuren langes Peptid CT $\alpha$  (G $\alpha$  (340-350) K341L; NH<sub>2</sub>-ILENLKDCGLF-COOH) verwendet [161]. Dieses Peptid wird in ähnlicher Art wie das Holoprotein vom Rezeptor gebunden und induziert kongruente strukturelle Änderungen sowohl im Peptid als auch im Rezeptor [143, 162, 163]. Die dazugehörige Spezies wird hier als Meta II<sub>c</sub> bezeichnet. Das Meta II<sub>c</sub>-Spektrum zeichnet sich überwiegend



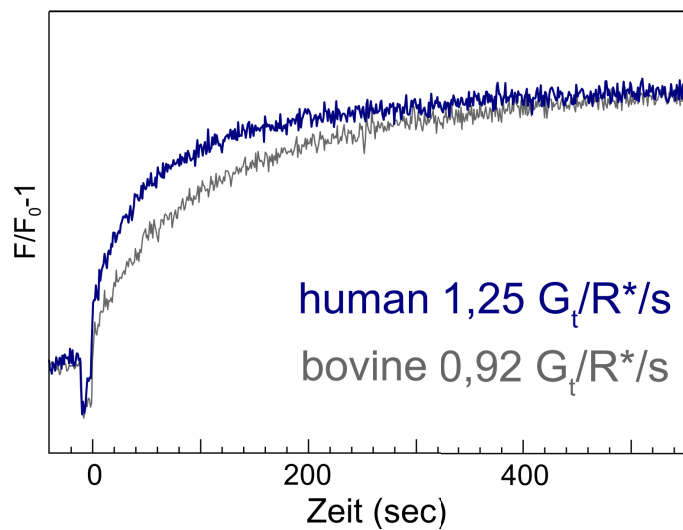
**Abbildung 3.21: Peptidinduzierte Bildung der aktiven Spezies**

**a-b)** Meta II<sub>b</sub>H<sup>+</sup>-Bedingungen, pH5 30°C. Humanes Rhodopsin (grüne Kurve), bovines Rhodopsin (graue Kurve). **a)** Komplexbildungsspektrum (Meta II<sub>c</sub>) aus Meta II<sub>b</sub>H<sup>+</sup> und CTα-Peptid des G-Proteins. **b)** *pbs*-Spektren (Differenzbildung aus Meta II<sub>c</sub> und Meta II<sub>b</sub>H<sup>+</sup>).

durch zwei zusätzliche Schwingungsmodi bei +1659 und 1558 cm<sup>-1</sup> aus. Diese Bandenlagen sind daher für die Protein-Peptid Interaktion spezifisch und veranschaulichen, dass beide Rezeptoren das Peptid erfolgreich binden können. Die peptidinduzierten Änderungen werden durch die Berechnung der Doppeldifferenz (*pbs*-Spektrum) sichtbar gemacht. Dabei wird vom Spektrum des Komplexes aus der aktiven Spezies mit dem Peptid (Meta II<sub>c</sub>) das Spektrum der aktiven Spezies (Meta II<sub>b</sub>H<sup>+</sup>) abgezogen. Die *pbs*-Spektren beider Spezies sind sehr ähnlich und weisen kaum Unterschiede auf, was dafür spricht, dass durch die Bindung dieses Peptids kongruente Änderungen in beiden Proteinen hervorgerufen werden.

### 3.3.10 G-Protein-Aktivierung

Über die Messung der Änderung der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz lässt sich die Rate der G-Protein-Bindung, induziert durch die Aufnahme von GTPγS bei pH7 und 20°C, bestimmen. Aus Abbildung 3.22 kann man anhand des Plateaus nach ca. 440s herleiten, dass beide Proteine in der Lage sind, Transducin vollständig zu binden und zu aktivieren. Die Bindungsgeschwindigkeit



**Abbildung 3.22: G-Protein Aktivierung**

Zunahme der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz vom humanen (blaue Kurve) und bovinem (graue Kurve) Rhodopsin in Abhängigkeit von der Zeit bei pH7 und 20°C (Die Daten wurden gemessen von Herrn Ronny Piechnick).

keit wurde aus dem initialen Anstieg errechnet. Die Kinetiken liegen beim humanen Rhodopsin bei 1,25  $G_t/R^*s$  (Transducin ( $G_t$ ) pro aktiviertem Rhodopsin ( $R^*$ ) und Sekunde (s)) und beim bovinen Rhodopsin bei 0,92  $G_t/R^*s$ . Um diesen Unterschied genauer beurteilen zu können, müssen jedoch weitere Experimente, wie Titration des G-Proteins, des pH-Wertes sowie des Nukleotids gemacht werden.

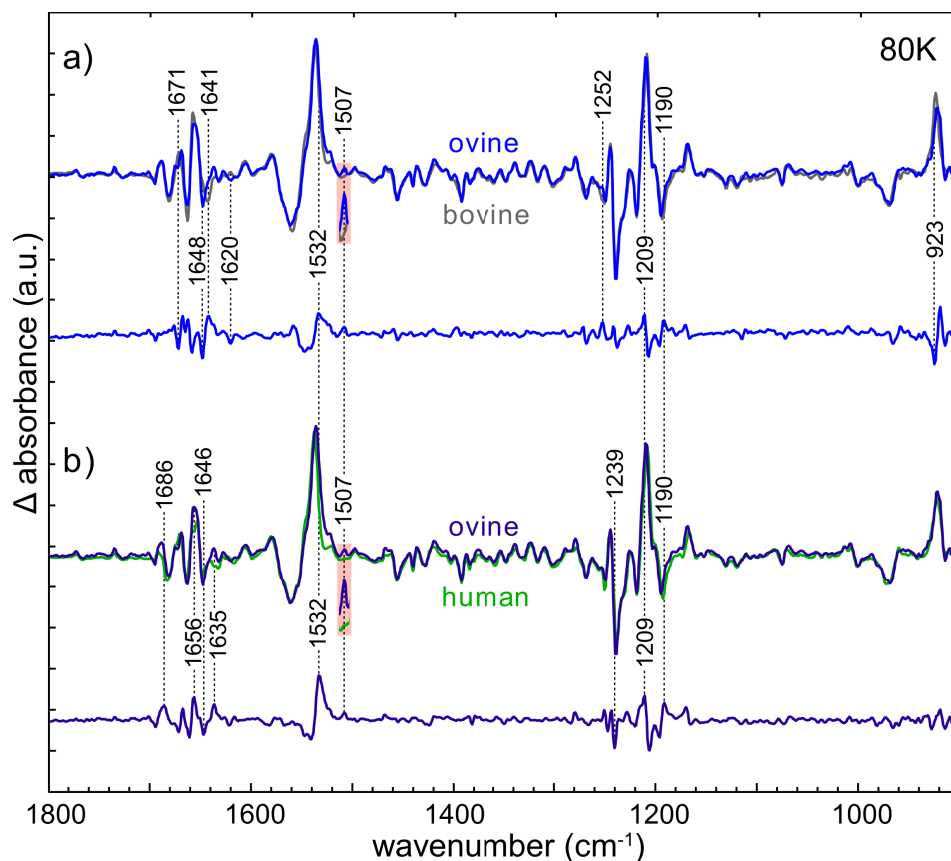
### 3.3.11 Fazit

Die Spektren aller Intermediate des humanen Rhodopsins weichen von den entsprechenden Spektren des bovinen Rhodopsins ab. Während bei den frühen Intermediate wie Batho und Lumi sowie bei der G-Protein-bindenden Spezies die Unterschiede relativ gering sind, fallen diese im Meta I-Zustand am größten aus. Dies hängt auch mit der unterschiedlichen Bildung von Meta I zusammen, wie es die Messungen bei -40°C zeigen. Die Unterschiede der Meta I-Spezies können teilweise durch die TEC-Chimäre wieder aufgehoben werden. Die Entstehung des humanen Meta II verläuft deutlich schneller, die Gleichgewichtskonstanten des Meta I / Meta II-Gleichgewichts unterscheiden sich wiederum aber nicht. Die aktive Spezies des humanen Rhodopsins ist in der Lage, das bovine G-Protein zu binden und zu aktivieren.

### 3.4 Ovines Rhodopsin

#### 3.4.1 Bathorhodopsin

Das Dunkelzustand  $\rightarrow$  Batho-Übergangsspektrum des ovinen Rhodopsins ist in Abbildung 3.23 als Überlagerung mit dem bovinen und dem humanen Rhodopsin dargestellt. Abweichungen sowohl zum humanen als auch zum bovinen Rhodopsin werden hauptsächlich in drei Bereichen festgestellt, nämlich in den Amid-I- und Amid-II-Bereichen sowie in der chromophorabhängigen Region um  $1200\text{ cm}^{-1}$ . Dennoch sind auch einige  $\Delta\epsilon$ -Banden in den beiden  $\Delta\epsilon$ -Spektren gleich, wie z.B. die positive  $\Delta\epsilon$ -Bande bei  $+1532\text{ cm}^{-1}$ , die durch die Verschiebung der markantesten Bande im Amid-II-Bereich von  $+1536\text{ cm}^{-1}$  im humanen Spektrum ( $+1537\text{ cm}^{-1}$  im bovinen) zu  $+1535\text{ cm}^{-1}$  im ovinen Spektrum hervorgerufen wird. Auf die gleiche Weise entstehen die  $\Delta\epsilon$ -Banden zwischen  $+1190$  und  $+1209\text{ cm}^{-1}$ .

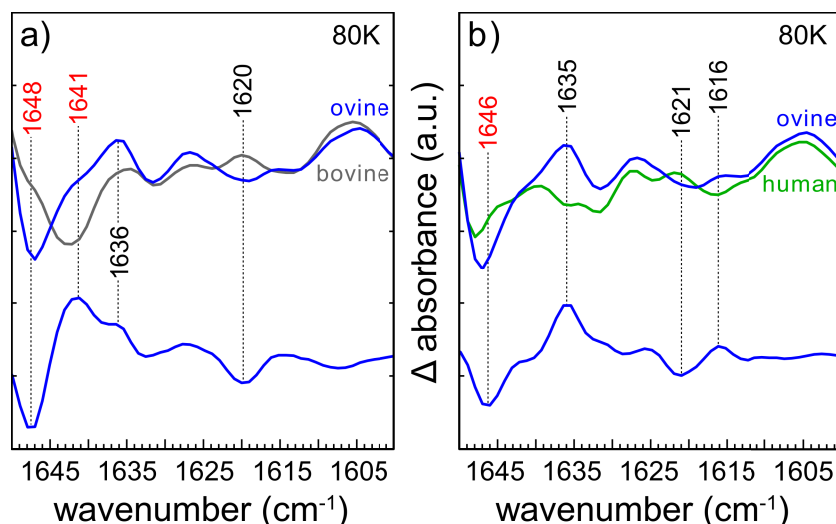


**Abbildung 3.23: Bathospektrum des ovinen Rhodopsins**

**a-b)** Ovines Rhodopsin (blaue bzw. dunkelblaue Kurve) unter Bathointermediat-stabilisierenden Bedingungen (80K pH7,4). Die positive Bande bei  $1507\text{ cm}^{-1}$  ist fünffach vergrößert und rot hinterlegt. **a)** Überlagerung mit dem Bathospektrum des bovinen Rhodopsins (graue Kurve). Die Doppeldifferenz ist blau. **b)** Überlagerung mit dem Bathospektrum des humanen Rhodopsins (grüne Kurve). Die Doppeldifferenz ist dunkelblau.

Die kleine positive  $\Delta$ -Bande bei  $+1507\text{ cm}^{-1}$  ist hingegen eine spezifische Eigenschaft des ovinen Bathorhodopsins (vergrößert und *rot* markiert in Abbildung 3.23), sie kommt weder im bovinen noch im humanen Spektrum vor und liegt im Schwingungsbereich der Tryptophan-Seitenketten [134].

Unterzieht man die Spektren jedoch dem Einzelvergleich, dann kommen auch spezielle Details zum Vorschein. In der Gegenüberstellung mit dem bovinen Rezeptor kann man eine positive  $\Delta$ -Bande bei  $+1252\text{ cm}^{-1}$  sowie  $\Delta$ -Banden  $-923/+917\text{ cm}^{-1}$  im HOOP-Bereich feststellen. Das Muster der  $\Delta$ -Banden im Amid-I-Bereich ( $-1671$ ,  $-1648$ ,  $+1641$ ,  $-1620\text{ cm}^{-1}$ ) unterscheidet sich von dem entsprechenden Muster aus dem ovine-humanen Vergleich ( $+1686$ ,  $+1656$ ,  $-1646$ ,  $+1635\text{ cm}^{-1}$ ). Die Region um  $1640\text{ cm}^{-1}$  ist besonders interessant und findet daher eine vergrößerte Darstellung in Abbildung 3.24. Das bovine Rhodopsin hat normalerweise eine negative Bande bei  $-1642\text{ cm}^{-1}$ , das ovine Rhodopsin hingegen generiert beim Übergangsspektrum zum Bathointermediat Banden bei  $-1647/+1636\text{ cm}^{-1}$ . Dies ruft dann das Bandendublett im  $\Delta$ -Spektrum bei  $-1648/+1651\text{ cm}^{-1}$  sowie eine Schulter bei  $+1636\text{ cm}^{-1}$  hervor. Im Gegensatz dazu hat das humane Rhodopsin die negative Bande an nahezu der gleichen Position ( $-1648\text{ cm}^{-1}$ ) wie das ovine Rhodopsin ( $-1647\text{ cm}^{-1}$ ), die Bande ist jedoch deutlich schwächer ausgeprägt. Diese Tatsache, sowie die Absenz der positi-



**Abbildung 3.24: Vergrößerte Darstellung des Bathospektrums**

**a-b)** Bathospektrum des ovinen Rhodopsins (blaue Kurve) im Bereich zwischen 1650 und 1600  $1/\text{cm}$ . **a)** Überlagerung mit dem Bathospektrum des bovinen Rhodopsins (graue Kurve). Die Doppeldifferenz ist blau. **b)** Überlagerung mit dem Bathospektrum des humanen Rhodopsins (grüne Kurve). Die Doppeldifferenz ist dunkelblau.

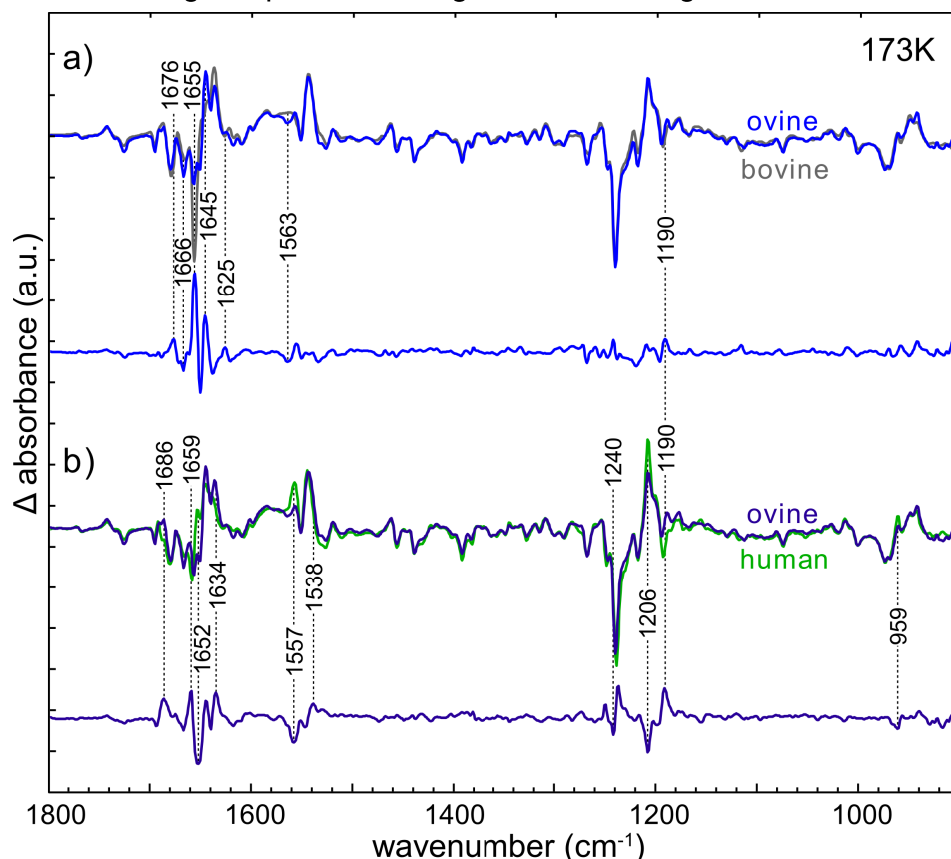


ven Bande bei  $+1636\text{ cm}^{-1}$  rufen dann die entsprechenden Bande bei  $-1646$  und  $+1635\text{ cm}^{-1}$  im  $_{dd}$ Spektrum hervor.

Im Schwingungsbereich des Chromophors befindet sich eine negative  $_{dd}$ Bande bei  $-1239\text{ cm}^{-1}$ . Diese wird durch die Verschiebung der negativen Bande bei  $-1237\text{ cm}^{-1}$  im ovinen Spektrum (dies ist auch die typische Bande beim bovinen Rhodopsin) zu  $-1236\text{ cm}^{-1}$  im humanen Spektrum (siehe Abschnitt 3.3.1) verursacht.

### 3.4.2 Lumirhodopsin

Die beim Bathointermediat gemachte Feststellung trifft auch beim Dunkelzustand  $\rightarrow$  Lumi-Übergangsspektrum zu: Das ovine Spektrum hat mit dem bovinen Spektrum größere Übereinstimmungen als mit dem humanen (Abbildung 3.25). Mit Ausnahme der intensiveren und stärkeren  $_{dd}$ Banden im Amid-I-Bereich sind die übrigen spektralen Regionen nahezu gleich, was sich aus dem



**Abbildung 3.25: Lumispektrum des ovinen Rhodopsins**

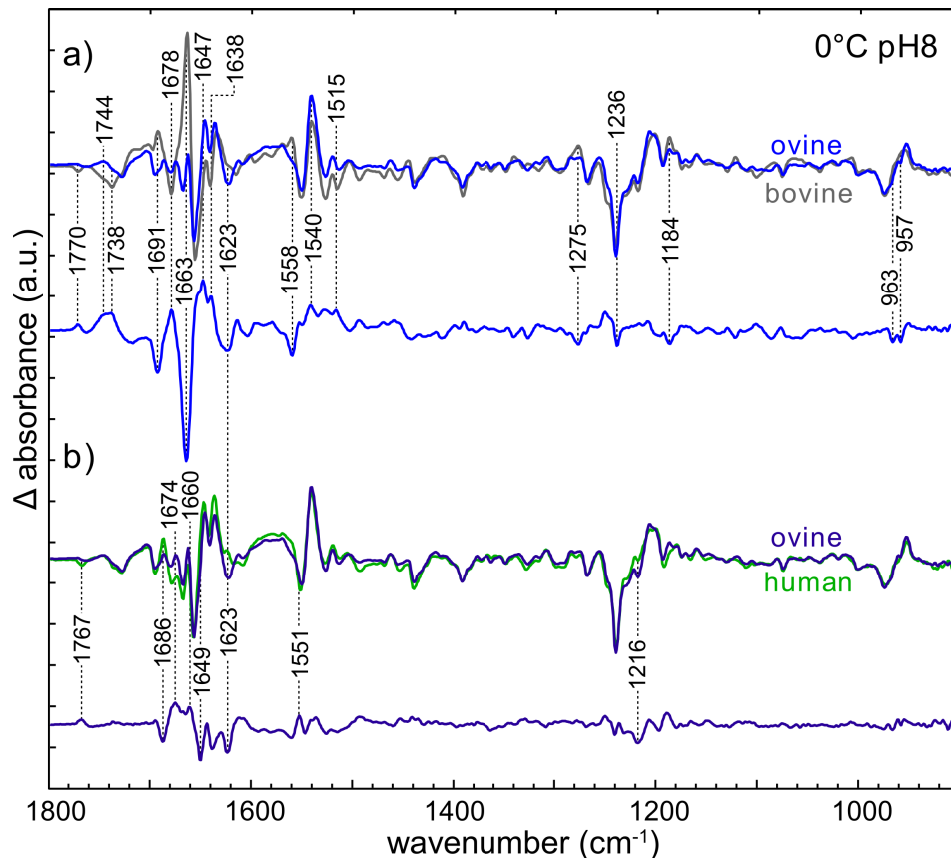
**a-b)** Ovines Rhodopsin (blaue bzw. dunkelblaue Kurve) unter Lumiintermediat-stabilisierenden Bedingungen (173K pH7,4). **a)** Überlagerung mit dem Lumispektrum des bovinen Rhodopsins (graue Kurve). Die Doppelwellenlinie ist blau. **b)** Überlagerung mit dem Lumispektrum des humanen Rhodopsins (grüne Kurve). Die Doppelwellenlinie ist dunkelblau.



dort nahezu bandenlosen  $\Delta\Delta$ -Spektrum ableiten lässt. Der Amid-I-Bereich ist jedoch durch viele  $\Delta\Delta$ -Banden gekennzeichnet, wobei die markanteste bei  $-1655\text{ cm}^{-1}$  liegt (Abbildung 3.25a) und durch die deutlich weniger intensive Bande bei der entsprechenden Wellenzahl im ovinen Spektrum verursacht wird. Neben dieser Bande existieren zahlreiche weitere  $\Delta\Delta$ -Banden in dieser Region z.B. bei  $+1676$ ,  $-1666$ ,  $-1650$ ,  $+1645$ ,  $-1637$  und  $+1625\text{ cm}^{-1}$ . Sonstige Divergenzen werden bei  $-1563$  und  $+1190\text{ cm}^{-1}$  beobachtet. Letztere ist auch deutlich stärker im  $\Delta\Delta$ -Spektrum präsent, welches aus der Differenzbildung des ovinen mit dem humanen Spektrum entsteht (Abbildung 3.25b). Dieses Spektrum zeichnet sich außerdem durch zahlreiche  $\Delta\Delta$ -Banden nicht nur im *fingerprint*-Bereich ( $-1240$ ,  $+1235$ ,  $-1206\text{ cm}^{-1}$ ) und im HOOP-Bereich ( $-959\text{ cm}^{-1}$ ) des Chromophors aus, sondern auch in den Amid-I- und Amid-II-Bereichen ( $+1686$ ,  $+1659$ ,  $-1652$ ,  $+1634$ ,  $-1557$  und  $+1538\text{ cm}^{-1}$ ).

### 3.4.3 Metarhodopsin I

Während die ersten beiden stabilisierbaren Photoprodukte des ovinen Rhodopsins sehr viel ähnlicher zu den Kryointermediaten des bovinen Rhodopsins sind, ändert sich dies beim Übergangsspektrum vom Grundzustand zu Meta I. Die Meta I-Übergangsspektren des bovinen und des ovinen Rhodopsins weisen große Unterschiede auf (Abbildung 3.26a), während die Meta I-Übergangsspektren des humanen und ovinen Rhodopsins einander sehr stark ähneln. Aus Abbildung 3.26b wird ersichtlich, dass das  $\Delta\Delta$ -Spektrum, errechnet aus den Meta I-Spektren der beiden Paarhufer, sehr große Ähnlichkeit mit dem  $\Delta\Delta$ -Spektrum aus humanem und bovinem Meta I (Abbildung 3.16a) hat. Demzufolge zeichnet sich das hier betrachtete  $\Delta\Delta$ -Spektrum durch zahlreiche und intensive Banden aus, die in ihrer Intensität mit den Banden der eigentlichen Übergangsspektren vergleichbar sind. Es lassen sich in nahezu allen spektralen Bereichen Unterschiede feststellen, wobei die meisten Bandenpositionen mit dem in Abbildung 3.16a dargestellten  $\Delta\Delta$ -Spektrum übereinstimmen und in Abschnitt 3.3.4 ausführlich beschrieben worden sind. Erwähnenswert sind jedoch jene  $\Delta\Delta$ -Banden, die spezifische spektrale Eigenschaften des ovinen Meta I repräsentieren und weder im bovinen noch im humanen Meta I vorkommen. Hierzu können die positive  $\Delta\Delta$ -Bande bei  $+1770\text{ cm}^{-1}$  ( $+1667\text{ cm}^{-1}$  in Abbildung 3.26b) sowie die negative Bande bei  $-1623\text{ cm}^{-1}$  gezählt werden. Erstere bildet den Protonierungssta-



**Abbildung 3.26: Meta I-Spektrum des ovinen Rhodopsins**

**a-b)** Ovinen Rhodopsin (blaue bzw. dunkelblaue Kurve) unter Meta I-stabilisierenden Bedingungen (0°C pH8). **a)** Überlagerung mit dem Meta I-Spektrum des bovinen Rhodopsins (graue Kurve). Die Doppeldifferenz ist blau. **b)** Überlagerung mit dem Meta I-Spektrum des humanen Rhodopsins (grüne Kurve). Die Doppeldifferenz ist dunkelblau.

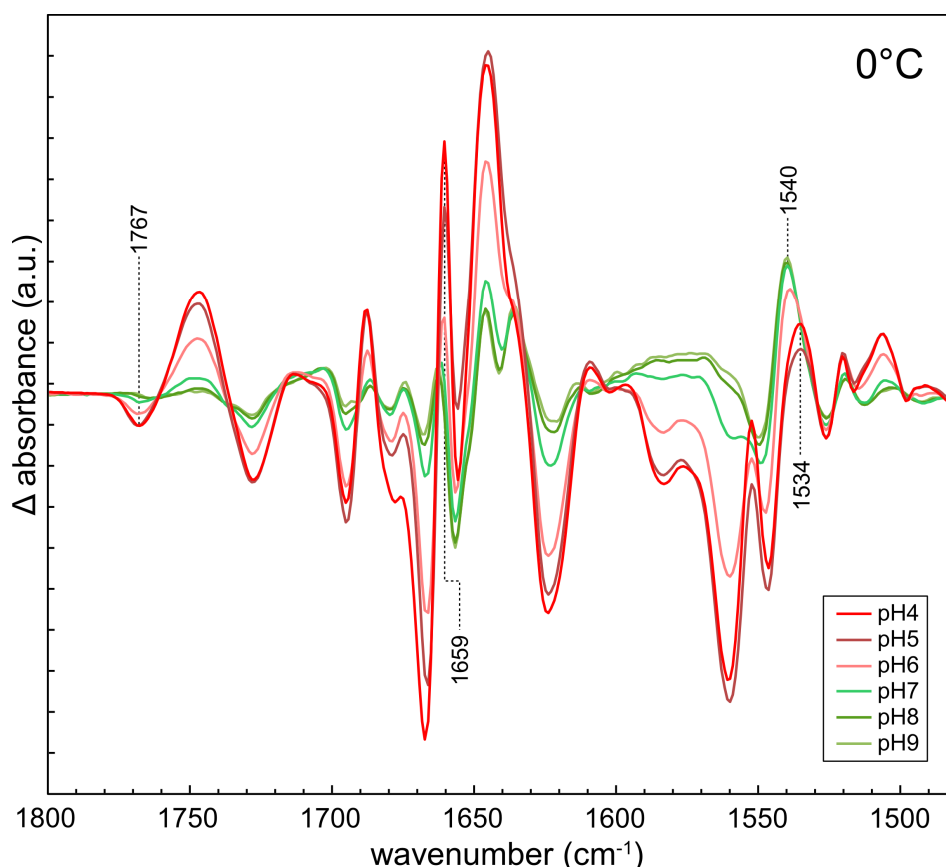
tus von Asp83 beim bovinen Rhodopsin ab und fehlt im ovinen Spektrum gänzlich. Die zweite Bande ( $1623\text{ cm}^{-1}$ ) ist im Laufe dieser Arbeit schon mehrfach als  $\text{dd}$ -Bande vorgekommen.

Abgesehen von den beiden spezifischen Bandenpositionen im ovinen Spektrum existieren im  $\text{dd}$ -Spektrum, welches die Unterschiede zwischen dem humanen und ovinen Spektrum abbildet, weitere Differenzen, die größtenteils in den Amid-I- und Amid-II-Bereichen liegen, wobei der Amid-I-Bereich am meisten betroffen ist. Im Großen und Ganzen zeichnen sich die Übergangsspektren durch zahlreiche Übereinstimmungen der wichtigsten Bandenpositionen aus.

### 3.4.4 Meta I / Meta II-Gleichgewicht

Die nachfolgend analysierten Messungen haben ein überraschendes Ergebnis zum Vorschein gebracht. Wie in Abbildung 3.26 dargestellt ist, sind insbe-

sondere die Übergangsspektren zum Meta I-Intermediat des ovinen und humanen Rhodopsins untereinander sehr ähnlich. Bis auf kleine Abweichungen in den Bandenpositionen und -intensitäten, die auf unterschiedlichen Grundzuständen und/oder Lipidumgebungen beruhen, sind die Spektren nahezu gleich. Erhöht man sukzessive die Protonenkonzentration, um den Übergang zur aktiven Spezies zu induzieren, beobachtet man die Entstehung des Meta II<sub>b</sub>H<sup>+</sup>-Intermediats, allerdings mit einer Abweichung. Wie aus Abbildung 3.27 ersichtlich wird, bildet sich neben dem gewöhnlichen Meta II-üblichen Bandenmuster die positive Bande bei  $\sim 1659\text{ cm}^{-1}$ , die eigentlich die Markerbande des bovinen Meta I-Intermediats ist (hier bei  $\sim 1661\text{ cm}^{-1}$ ) und beim humanen Rhodopsin völlig vermisst wird (siehe Abschnitt 3.3.4, Abbildung 3.16). Darüber hinaus ist diese Bande für peptidinduzierte Komplexbildung charakteristisch (Meta II<sub>c</sub>, Abschnitt 3.3.9).



**Abbildung 3.27: pH-Wert-Abhängigkeit des ovinen Rhodopsins bei 0°C**

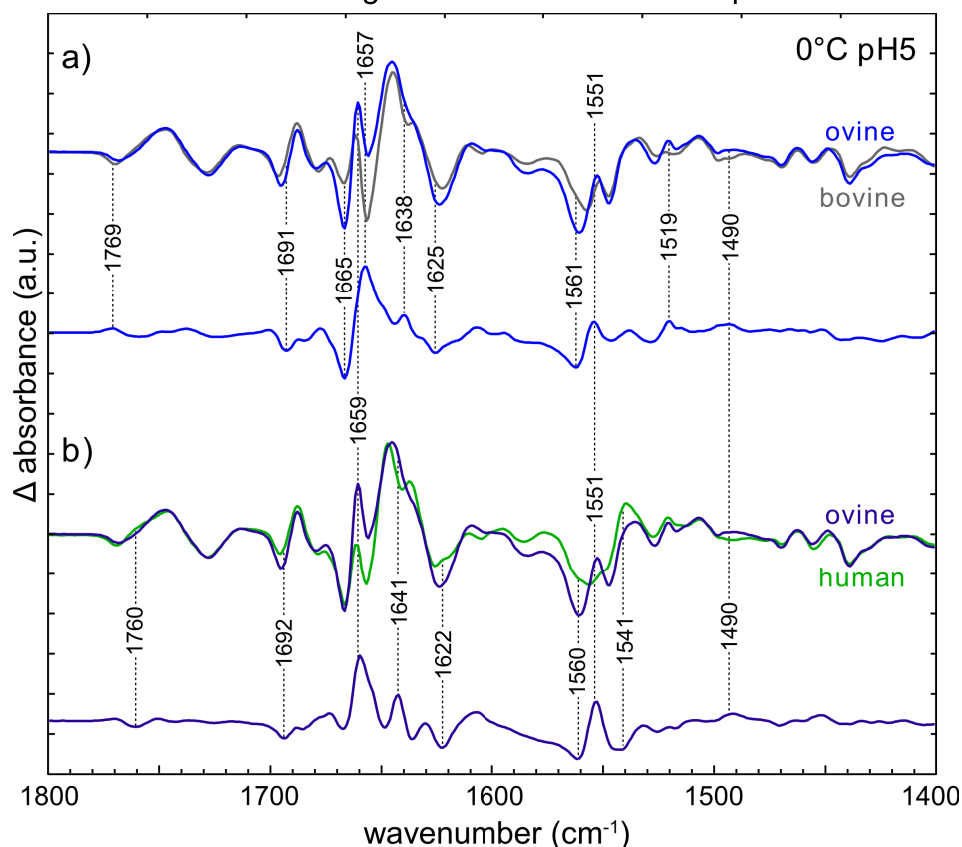
Ein Ausschnitt des gemessenen Bereiches zwischen 1800 und 1480  $1/\text{cm}$ . Die sauren pH-Werte sind laut der Legende Schattierungen der roten Farbe, die basischen und der neutrale pH-Werte dementsprechend der grünen Farbe. Ein besonderer Augenmerk liegt auf der Ausprägung der positiven Bande bei 1659  $1/\text{cm}$ .

### 3.4.5 Metarhodopsin II

Abschließend wird in Abbildung 3.28 ein Vergleich der Spektren der aktiven Spezies (Meta II<sub>b</sub>H<sup>+</sup>, 0°C pH5) vom ovinen Rhodopsin mit bovinem und humanem Rhodopsin im Bereich zwischen 1800 und 1400 cm<sup>-1</sup> gezeigt.

Es lassen sich mehrere <sub>dd</sub>Banden registrieren, die den beiden <sub>dd</sub>Spektren gemeinsam sind. Es handelt sich um die positiven <sub>dd</sub>Banden bei +1551 und +1490 cm<sup>-1</sup> sowie die negativen <sub>dd</sub>Banden bei -1490 cm<sup>-1</sup>, -1691 bzw -1692 cm<sup>-1</sup> und -1625 bzw. -1622 cm<sup>-1</sup>.

Das Spektrum des ovinen Rhodopsins zeichnet sich durch die intensive positive Bande bei +1659 cm<sup>-1</sup> aus. Dies beeinflusst die umliegenden Bandenlagen und ist demzufolge mitverantwortlich für zahlreiche <sub>dd</sub>Banden im Amid-I-Bereich der beiden <sub>dd</sub>Spektren. Im Übergangsspektrum des ovinen Rhodopsins fehlt die negative Bande bei -1656 cm<sup>-1</sup>, stattdessen ist die negative Bande bei -1665 cm<sup>-1</sup> deutlich stärker ausgebildet als im bovinen Spektrum. Diese Unter-



**Abbildung 3.28: Meta II-Spektrum des ovinen Rhodopsins**

**a-b)** Ovines Rhodopsin (blaue bzw. dunkelblaue Kurve) unter Meta II-stabilisierenden Bedingungen (0°C pH5). **a)** Überlagerung mit dem Meta II-Spektrum des bovinen Rhodopsins (graue Kurve). Die Doppelabsorption ist blau. **b)** Überlagerung mit dem Meta II-Spektrum des humanen Rhodopsins (grüne Kurve). Die Doppelabsorption ist dunkelblau.

schiede rufen die dominierenden Banden des  $\Delta\Delta$ -Spektrums bei  $-1665$ ,  $+1657$  und  $+1638\text{ cm}^{-1}$  hervor. Korrespondierend zu den Bandenlagen im Amid-I-Bereich sind auch Abweichungen im Amid-II-Bereich an den  $\Delta\Delta$ -Banden bei  $-1561$  und  $+1551\text{ cm}^{-1}$  feststellbar. Die negative Bande des bovinen Asp83 bei  $-1768\text{ cm}^{-1}$  befindet sich beim ovinen Rhodopsin bei  $-1767\text{ cm}^{-1}$  und verursacht daher die  $\Delta\Delta$ -Bande bei  $-1769\text{ cm}^{-1}$ . Insgesamt zeichnet sich der Bereich der Carboxylschwingungen durch zahlreiche abgeflachte  $\Delta\Delta$ -Banden aus, die auf geringfügigen Verschiebungen der Bandenpositionen im ovinen Spektrum beruhen.

Im  $\Delta\Delta$ -Spektrum, welches aus der Überlagerung des ovinen mit dem humanen Übergangsspektrum hervorgeht (Abbildung 3.28b), sind die Amid-Bereiche jedoch andersartig gestaltet und unterscheiden sich vom  $\Delta\Delta$ -Spektrum aus Abbildung 3.28a. Dies liegt zumindest im Falle des Amid-I-Bereichs daran, dass die negative Bande bei  $-1665\text{ cm}^{-1}$  im humanen Spektrum die gleiche Ausprägung hat wie im ovinen, die positive Bande bei  $+1659\text{ cm}^{-1}$  ist dagegen im ovinen Meta II intensiver als im humanen. Im Amid-II-Bereich ist die  $\Delta\Delta$ -Bande bei  $-1541\text{ cm}^{-1}$  hervorzuheben. Diese ist beim humanen Rhodopsin intensiver und unterscheidet sich in ihrer Ausprägung sowohl vom ovinen als auch vom bovinen Spektrum.

### 3.4.6 Fazit

Die Übergangsspektren aller Intermediate des ovinen Rhodopsins unterscheiden sich sowohl von der bovinen als auch von der humanen Referenz. Während die Spektren der frühen Intermediate stärker den bovinen als den humanen Spektren ähneln, ist es im Falle von Meta I und Meta II genau umgekehrt. Besonders interessant ist das Verhalten der bovinen Meta I-Markerbande um  $+1660\text{ cm}^{-1}$ . Im ovinen Meta I wird sie vermisst, bildet sich aber pH-Wert-abhängig bei der Entstehung der aktiven Spezies.



## 4 DISKUSSION

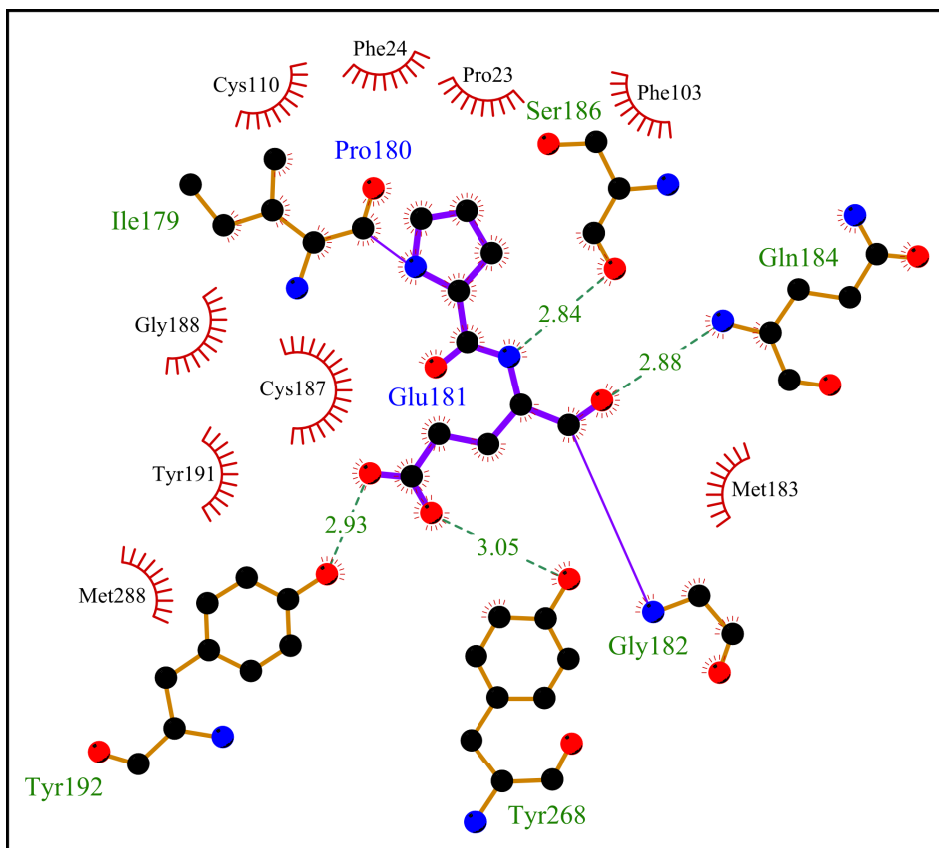
### 4.1 Bovines Rhodopsin

Rhodopsin fungiert als Modellsystem für die Erforschung des Aktivierungsmechanismus von GPCRs. Die intensive Forschung seit seiner Entdeckung hat zahlreiche Erkenntnisse über die molekular-mechanischen Schaltungsvorgänge, die der Rezeptor auf dem Weg zur aktiven Konformation vollführt, zum Vorschein gebracht. Diese Vorgänge induzieren letztlich Konformationsänderungen, die über Bewegungen von Sekundärstrukturelementen realisiert werden. Diese Bewegungen können Rotationen oder ein Ausklappen von Helices sein, aber auch Umlagerungen und Strukturierungen von Loops, jedoch erfolgen sie erst bei der Bildung der späten Intermediate, wie Meta I und Meta II [164]. In der Phase der frühen Intermediate hingegen müssen diese Bewegungen vorbereitet werden. Die beobachteten Änderungen in den Spektren der frühen Intermediate hängen demnach ausschließlich mit der direkten Umgebung des Retinals (Bindungstasche, Batho-Intermediat) und der unmittelbaren Umgebung der Bindungstasche (Lumi-Intermediat) zusammen, was auch aus den Spektren der Y206F-Mutante abgeleitet werden kann. Während das Bathorhodopsin dieser Mutante unbeeinflusst geblieben ist, zeigt das Lumi-Spektrum mutationsbedingte Abweichungen im Schwingungsmuster.

#### 4.1.1 Auswertung

**Die Tyrosine 191 und 192 koordinieren die Bewegungen von Glu181.** Aus den Kristallstrukturen des dunkeladaptierten Rhodopsins lässt sich eine Interaktion zwischen den Tyrosinseitenketten und Glu181, dem transienten Gegenion der Schiffsbasis, ableiten (Abbildung 4.1). Die Glutaminsäure wird dabei im Dunkelzustand von den Tyrosinen 192 und 268 über Wasserstoffbrücken fixiert. Zusätzlich bildet Tyr268 eine Brücke zum Tyr191 aus [71, 96].

Durch dieses "Festhalten" der negativen Seitenkette, die sich in unmittelbarer Nähe zur Schiffischen Base befindet, wird zunächst die spontane Deprotonierung unterbunden, darüber hinaus die TM6 an EL2 und Bindungstasche gekoppelt, das 11-*cis*-Retinal umklammert und somit in der inaktiven Konformation stabilisiert. Diese Fixierung von Glu181 wird in den Batho- und Lumi-Spektren der Y192F-Mutante beobachtet, denn diese Mutante ist wegen der fehlenden OH-Gruppe im Phenylalanin nicht in der Lage, eine Wasserstoffbrücke zum Glu181 auszubilden. Das Batho-Spektrum zeichnet sich durch das Fehlen der negativen Bande bei  $1249\text{ cm}^{-1}$  sowie der Präsenz einer zusätzlichen Bande bei  $1622\text{ cm}^{-1}$  aus (siehe Abbildung 3.5). Diese Wellenzahlen lassen sich auf Streckschwingungen von Tyrosinseitenketten zurückführen [134]. Im Lumi-Spektrum lässt sich eine zusätzliche Bande im Bereich der Carboxylgruppen bei  $1704\text{ cm}^{-1}$  beobachten, die auf Glu181 zurückgeführt werden kann (siehe Abbildung 3.8). Im Falle der Y191F-Mutante ist eine Interaktion zwischen den



**Abbildung 4.1: Interaktionspartner von Glu181 im Grundzustand**

Die Kalkulationen der elektrostatischen Umgebung um die Glutaminsäure 181 ergeben dass nicht nur die Seitenkette Wasserstoffbrücken zu den Tyrosinseitenketten 192 und 268 mit den Abständen von 2,93 bzw. 3,05 Å ausbildet, sondern dass ihre Grundgerüstatome Kopplungen zu Ser186 und Gln184 haben. *LigPlot*<sup>+</sup>-Darstellung [149] auf der Basis der Rhodopsin-Kristallstruktur (pdb: 1U19 [96])



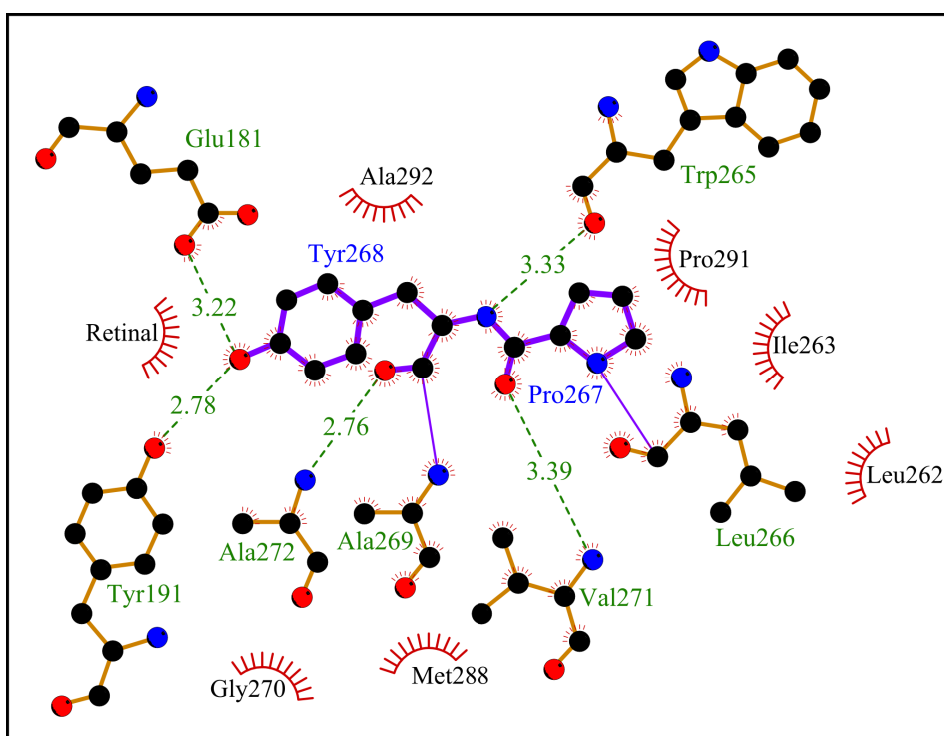
Tyrosinen 268 und 191 nicht möglich, daher hat Tyr268 bereits in den ersten Schritten des Aktivierungsmechanismus eine größere Bewegungsfreiheit, die es getrieben durch den *toggle switch* des Trp265 (siehe Abschnitt 1.5.8.2) vollführt. Dies äußert sich in zahlreichen Banden, die auf die Vibrationen der Tyrosinseitenketten zurückzuführen sind (z.B. 1251, 1515, 1522  $\text{cm}^{-1}$  [134]). Dies wird zudem durch die Kristallstruktur des Bathorhodopsins belegt: Der Abstand zwischen Tyr268 und Tyr191 wird größer (2,54 Å anstatt 2,47 Å im Grundzustand) [165]. Im Lumi-Zustand (Abbildung 4.2) setzt sich diese Entwicklung fort: Hier vergrößert sich nicht nur der Abstand zwischen Tyr191 und Tyr268 um weitere 0,24 Å, sondern auch zwischen Tyr268 und Glu181 (3,22 Å anstatt 3,05 Å im Batho- und Grundzustand). Wichtiger dabei ist jedoch die Feststellung, dass die Brücke zwischen Tyr192 und Glu181 zerbricht [166].

Die  $\delta\delta$ -Banden der Batho- und Lumi-Spektren im Bereich 1652-1695  $\text{cm}^{-1}$  sind u.a. durch die veränderten Vibrationen der Guanidiniumgruppe des Arg177 bedingt [134], denn die Tyrosine 191 und 192 sind Teil eines größeren Wasserstoffbrückennetzwerks, den die benachbarten Aminosäuren zu anderen  $\beta$ -Strängen des EL2 ausbilden. Insbesondere sind hier Asp190 und Thr193 hervorzuheben, die mehrere Brücken zum Arg177 aufweisen. Diese Interaktionen sind durch die inkorporierten Mutationen an den Positionen 191 und 192 beeinflusst und in den Spektren der frühen Intermediate abgebildet.

Im Lumi-Zustand werden die Positionsänderungen der Sekundärstrukturelemente, die sich beim Übergang zum Meta I-Intermediat vollziehen, vorbereitet. Das schließt sowohl das Loslösen der Verankerungen der Helices 5 und 6 als auch die Freigabe von Glu181 und eventuell ihre anfängliche Bewegung in Richtung der Schiffchen Base mit ein. Die Meta I-Spektren der Tyrosin-Mutanten 191 und 192 sprechen dafür, dass die kontrollierte Bewegung von Glu181 und die Bildung des komplexen Gegenions der Schiffchen Base gestört, jedoch nicht verhindert wird. Die beiden Spektren sind zwar gut mit dem Spektrum des WT-Meta I vergleichbar, zeichnen sich aber vor allem bei der Y192F-Mutante durch zahlreiche verschobene bzw. fehlende Banden aus (siehe Abbildung 3.9). Nichtsdestotrotz wird ein Intermediat gebildet, das in beiden Fällen sowohl mittels FTIR als auch durch UV-Vis-Spektroskopie als Meta I identifiziert werden kann, was letztlich den Schluss zulässt, dass Glu181 gemeinsam mit Glu113 die protonierte SB stabilisiert.

Die Bildung der aktiven Spezies erfordert allerdings eine Deprotonierung der Schiffchen Base (siehe Abschnitt 1.3). Dafür muss durch deren Umgebung eine Situation geschaffen werden, die dies begünstigt, indem die den protonierten Zustand stabilisierenden Reste von der Schiffchen Base wegbewegt werden. Die unter Meta II-Bedingungen durchgeführten Messungen zeigen, dass diese Aufgabe von Tyr191 übernommen wird. Die Y191F-Mutante ist nicht in der Lage, unter Meta II-favorisierenden Bedingungen die aktive Spezies zu bilden, denn sie wirkt sich stark auf das Meta I / Meta II-Gleichgewicht aus (siehe Abbildung 3.10), in dem es dieses auf die Seite von Meta I verlagert. Tyrosin 191 ist inmitten des EL2 platziert. Bei der Bildung von Meta I muss eine starke Brücke zwischen den Seitenketten von Glu181 und Tyr191 entstehen, denn beim Übergang zum Meta II erfolgt eine gekoppelte Bewegung von TM5 und EL2 [167], was letztlich das Wegbewegen des Gegenions von der Schiffchen Basen bewerkstelligt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Tyrosine 191 und 192 im Zusammenspiel mit Tyrosin 268 die Orientierung und Bewegungen des transi-



**Abbildung 4.2: Interaktionspartner von Tyr268**

*LigPlot*<sup>+</sup>-Darstellung [149] der elektrostatischen Situation um das Tyr268 im Lumi-Zustand (pdb-id.: 2HPY [166]). Im Gegensatz zum Grundzustand ist die Wasserstoffbrücke von Tyr268 zum Tyr192 aufgebrochen. Stattdessen wurde eine neue kurze (2,78 Å) Wasserstoffbrücke zum Tyr191 ausgebildet. Die Verbindung zwischen Glu181 und Tyr192 zerfällt ebenfalls.

enten Gegenions der Schiffschens Base über den gesamten Aktivierungsprozess des Rezeptors steuern. Während die Tyrosine 192 und 268 ihre Beiträge in den ersten Schritten der Aktivierung und vor allen im Dunkelzustand leisten, ist vor allem die Hydroxylgruppe des Tyr191 für die Bildung der aktiven Spezies von maßgeblicher Bedeutung.

Durch die Kombination der Mutationen der Tyrosine 191 und 223 konnte erstmalig die Aktivierung des Rezeptors im Meta I gestoppt werden. Hierbei addieren sich die Effekte, die die Einzelmutationen auf den Aktivierungsmechanismus haben. Während durch die Y191F-Mutante das Deprotonieren der Schiffschens Base stark erschwert wird, unterbindet die Y223F-Mutation die assistierende Rolle des Tyr223 beim Protonieren des *ionic locks*.

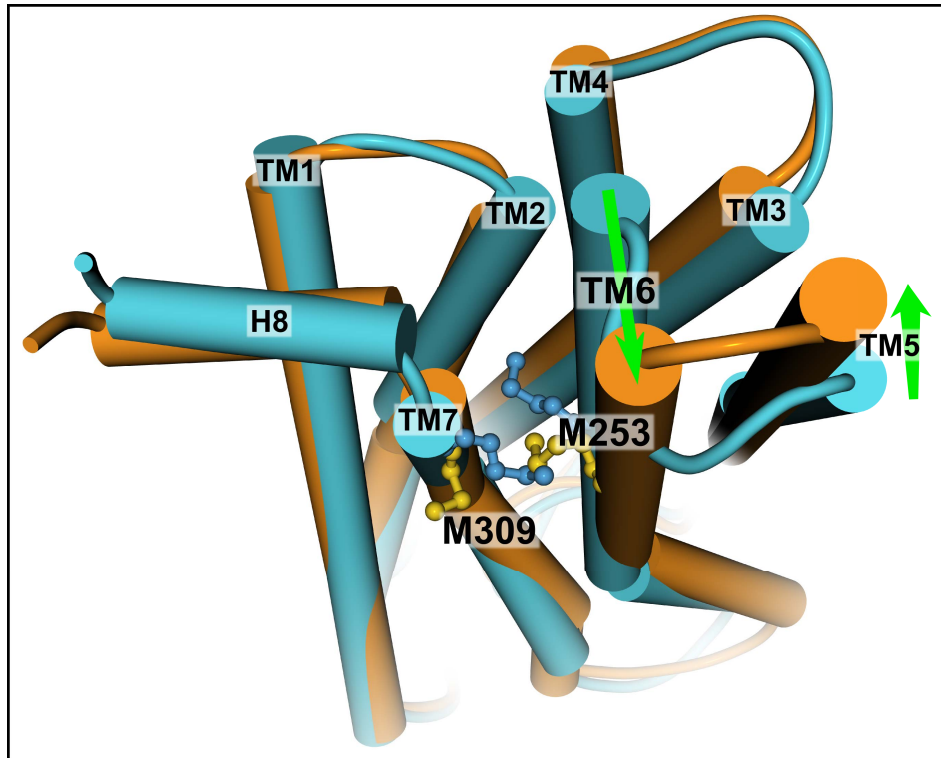
**Das Tyrosin 206 beeinflusst die Bildung der aktiven Spezies** durch Beteiligung an der gekoppelten Bewegung von TM5 und EL2. Diese Feststellung wird aus den Meta I- und Meta II-Spektren der Y206F-Mutante abgeleitet. Wegen der fehlenden OH-Gruppe am Phenylring kann diese Mutante keine Wasserstoffbrücke zum His211 ausbilden, die normalerweise zwischen den Seitenketten 206 und 211 im Grundzustand besteht (siehe Abbildung 1.11). Die Einflüsse dieser Mutation auf den Aktivierungsmechanismus werden erst bei der Bildung des Lumi-Intermediats sichtbar, denn das Batho-Spektrum unterscheidet sich nicht von dem des Wildtyps. Besonders interessant ist die zusätzliche positive Bande bei  $^{+1713\text{ cm}^{-1}}$  im Lumi-Spektrum der Mutante (siehe Abbildung 3.7). Der Position nach zu urteilen, ist die neue Bande höchstwahrscheinlich auf das His211 zurückzuführen. Dieses könnte demzufolge nun anstelle der Interaktion mit Tyr206 eine Wasserstoffbrücke mit Glu122 eingehen, denn die Schwingungsfrequenz bei  $^{+1713\text{ cm}^{-1}}$  entspricht einer Seitenkette der Glutaminsäure mit zwei Wasserstoffbrückenbindungen [155]. Eine ähnliche Situation wird auch im Meta I-Spektrum der Mutante beobachtet. Hier sind jedoch die Banden, die durch Carboxylgruppen verursacht werden, noch stärker ausgeprägt (z.B. die asymmetrischen Streckschwingungen einer deprotonierten Glutaminsäure bei  $1556\text{-}1560\text{ cm}^{-1}$ ). Der signifikante Anteil (18%) der Meta I-Spezies unter Meta II-Bedingungen im Falle der Y206F-Mutante deutet darauf hin, dass das Tyrosin 206 an den gekoppelten Bewegungen der TM5 und EL2 beteiligt ist. Der starre Hebelarm, den der EL2 darstellt [167], wird

durch fehlende Interaktionen der OH-Gruppe in der Y206F-Mutante flexibilisiert. Die stabilisierenden  $\pi$ -*stacking*-Interaktionen mit Phe203 und Trp175 werden dennoch beibehalten. Der Beitrag dieser Kopplung kann studiert werden, wenn anstelle eines Aromaten an der Position 206 eine andere Aminosäure inkorporiert wird.

Die Y206F-Mutation wirkt sich sowohl auf die Wasserstoffbrückennetzwerke und somit auf die Schwingungen der Glutaminsäuren aus als auch auf die Konformationsänderungen, die zum Meta I- und Meta II-Zustand hin stattfinden.

**Der Methionin-Cluster stabilisiert den Meta I-Zustand.** Basierend auf den hier vorgestellten Daten kann eine Hypothese über die Funktion des Methionin-Clusters aufgestellt werden. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die entscheidenden strukturellen Änderungen beim Übergang zum Meta I im Bereich der sechsten Helix auftreten [76, 97, 100]. Die Übertragung der in der Isomerisierung des Retinals gespeicherten Lichtenergie an das Grundgerüst der TM6 mittels einer Bewegung von Trp265 (*toggle switch*) induziert eine Rotation dieser Helix [168]. Diese Drehung hat zur Folge, dass zum einen dadurch das Ausklappen der Helix (Abbildung 4.3) im nächsten Schritt der Aktivierungskade vorbereitet wird und zum anderen die stabilisierenden Interaktionen ihres cytoplasmatischen Endes mit dem *ionic lock* herabgesetzt werden, was schließlich die spätere Protonierung dieser Mikrodomäne ermöglicht bzw. erleichtert. Die Drehung hat jedoch noch eine weitere Funktion, wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen werden.

Die Deletion des Methionins 309 bewirkt, dass die um eine Aminosäure verkürzte Übergangsregion zwischen der TM7 und H8 neugestaltet wird. Dies bedeutet, dass die ursprüngliche Position des Met309 von Met308 übernommen werden kann. Die gleiche Argumentation ist auch für M309A-Mutante zutreffend, sodass in beiden Fällen eine nahezu unbeeinflusste Funktion des Rezeptors gewährleistet werden kann. Die  $\Delta$ 308/M309A-Mutante hingegen ist nicht mehr in der Lage, an der Cluster-Bildung mit der TM6 teilzunehmen, denn eines der beiden Methionine ist deletiert und das andere durch das Alanin substituiert worden. Dies hat zur Folge, dass das Meta I / Meta II-Gleichgewicht in ähnlicher Weise wie bei den M253A- und M257C-Mutanten in Richtung der aktiven Spezies verschoben wird.



**Abbildung 4.3: Ausklappen der sechsten TM im aktiven Zustand**

Überlagerung der Kristallstrukturen vom inaktiven (hellblau, pdb-id: 1U19 [96]) und aktiven Zustand (orange, pdb-id: 3PXO [82]). Das Ausklappen der TM6 sowie die Verlängerung und Positionsänderung der TM5 sind durch grüne Pfeile markiert. Ebenfalls sind die Positionen der Methionine 253 und 309 im inaktiven Zustand (blau) und im aktiven Zustand (gelb) eingezeichnet.

Daraus kann abgeleitet werden, dass die vier Methionine bei der Stabilisierung des Übergangszustandes (Meta I) zur aktiven Spezies eine nicht unbedeutende Rolle spielen. Möglicherweise koordiniert dieser Cluster die Bewegung der sechsten Transmembranhelix mit anderen strukturellen Determinanten beim Meta I  $\rightarrow$  Meta II-Übergang.

Diese Koordination der Bewegungsabläufe kann sich folgendermaßen vorgestellt werden: Es ist bekannt, dass Tyr306 beim Übergang zum Meta II in Richtung des *ionic locks* schwenkt und letztendlich mit diesem interagiert. Bislang war jedoch unklar, was die treibende Kraft dieser Bewegung ist bzw. wodurch diese Positionsänderung ausgelöst und gesteuert wird. Aus den vorhandenen Kristallstrukturen des aktiven und bindenden Zustands ([82, 85, 142, 169]) sowie den in dieser Arbeit beobachteten Gleichgewichtsverschiebungen durch Methionin-Mutanten kann abgeleitet werden, dass die TM6 hierbei eine Schlüsselrolle übernimmt. Einerseits wird durch das Rotieren und Ausklappen der Helix die hydrophobe Barriere zwischen der cytoplasmatischen Oberfläche und

der Schiffschen Base aufgelöst sowie der Raum freigegeben, der in der aktiven Konformation durch das Tyr306 eingenommen wird, andererseits führt das Ausklappen der Helix dazu, dass die beiden Methionine der TM6 einen Druck auf das Met309 aus dem NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motiv ausüben. Dieser Druck wird mittels Positionsänderung des Met309 über das Proteingrundgerüst an das Tyr306 weitergeleitet. Infolge dessen werden die stabilisierenden  $\pi$ -stacking-Interaktionen zwischen Tyr306 und Phe313 aufgebrochen, was eine kontrollierte Bewegung der Tyrosinseitenkette nach sich zieht.

#### 4.1.2 Schlussfolgerung

Im Zuge der vorliegenden Arbeit haben sich Hinweise gehäuft, die auf eine besondere Funktion der Tyrosinseitenketten im Rhodopsin schließen lassen. Diese Erkenntnisse lassen sich voraussichtlich nicht nur auf weitere GPCRs, sondern auch allgemeingültig auf andere Proteinsysteme übertragen. Die Studien an Tyr223, Tyr306 und den hier behandelten Tyrosinseitenketten an den Positionen 191, 192 und 206 suggerieren eine besondere attrahierende Eigenschaft, die zahlreiche Bewegungen der Sekundärstrukturelemente steuert bzw. ermöglicht. Darunter soll folgendes verstanden werden: Die Seitenkette des Tyrosins ist planar aufgebaut, das konjugierte  $\pi$ -Elektronensystem des aromatischen Ringes kann die reaktive Hydroxylgruppe gut abschirmen. Die kurze, nur durch eine Bindung gestaltete Anknüpfung der Seitenkette an das Proteingrundgerüst resultiert in einer sehr stark geminderten Bewegungsfreiheit dieser Seitenkette. Dies bedeutet, dass die Seitenkette nur wenige stabile Energieminima besitzt, die durch sehr wenige Rotamere realisiert werden, was wiederum eine exakte Positionierung und Ausrichtung der reaktiven Gruppe ermöglicht. Diese Positionierung wird zusätzlich durch stabilisierende Interaktionen des  $\pi$ -Elektronensystems von Tyrosin mit weiteren konjugierten  $\pi$ -Elektronensystemen oder geladenen Seitenketten gestärkt ( $\pi$ -stacking). Ein Beispiel hierfür sind Interaktionen von Tyr206 mit der Umgebung. Die hohe Differenz der pKa-Werte der Hydroxylgruppe eines Tyrosins und beispielsweise der Carboxylgruppe einer benachbarten Glutaminsäure bewirkt, dass das Tyrosin gerichtete Wasserstoffbrücken ausbilden kann. Die Ausbildung solcher Brücken kann attraktive Kräfte zwischen zwei Sekundärstrukturelementen freisetzen, was schließlich zur definierten Positionsänderung dieser Elemente führt. Gleicher-

maßen sorgen diese Brücken für die Stabilisierung dieser Elemente in den jeweiligen Übergangszuständen.

Es lassen sich mehrere Beispiele solcher Wechselwirkungen im Rhodopsin angeben: Die Tyrosine 223 und 306 orientieren sich etwa beim Übergang zu Metarhodopsin II zum *ionic lock*, wobei Tyr223 das Heranziehen der TM5 induziert. Die in diesem Kapitel behandelten Tyrosine 191 und 192 spielen eine vergleichsweise bedeutende Rolle, wirken jedoch an einer anderen Stelle des Rezeptors und zu einem früheren Stadium des Aktivierungsmechanismus. Ähnlich wie die funktionellen Domänen auf der cytoplasmatischen Seite des Rezeptors und die Gegenione der Schiffsbasis Glu113 und Glu181, sind diese beiden Tyrosine nicht nur über die Linie der Mammalia, sondern auch bei den Vertebraten-Rhodopsinen hochkonserviert. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die besondere Aufgabe, die den beiden Seitenketten zugeordnet wird.

Die Beeinflussung des Meta I / Meta II-Gleichgewichts durch Mutationen am Methionin-Cluster offenbart, dass die wichtigste Aufgabe dieses Clusters die Bildung einer hydrophoben Barriere zwischen der Schiffsbasis und der cytoplasmatischen Seite des Rezeptors ist. Dadurch wird ein Wasserinflux ins Innere des Proteins unterbunden, sodass die Schiffsbasis zu einem bestimmten Zeitpunkt der Aktivierung deprotonieren kann. Dies schließt auch die Stabilisierung des Übergangszustands Meta I mit ein. Die Koordination der Positionsänderung des Tyr306 zum *ionic lock* durch den Methionin-Cluster als Folge der Ausklappbewegung der TM6 ist bislang eine Hypothese und bedarf weiterführender Experimente und MD-Simulationen. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass die Methionine dieses Clusters einen Teil der Interaktionsoberfläche mit dem G-Protein darstellen [85], lässt sich darüber hinaus vermuten, dass diese Verzahnung bei nachfolgenden Interaktionen der aktiven Spezies mit Transducin und/oder Arrestin für eine korrekte Positionierung der cytoplasmatischen Bereiche erforderlich ist.

### 4.1.3 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten neue Aspekte des Aktivierungsmechanismus des bovinen Rhodopsin entdeckt werden. Insbesondere wurde die Rolle der Tyrosine bei der Koordination von Konformationsänderungen hervorgehoben. Mithilfe der Y191F- und Y192F-Mutanten konnte gezeigt werden, wie

diese Reste zusammen mit Tyr268 den Protonentransferprozess an der Schiff-schen Base über die Positionierung von Glu181 steuern. Über die Kombination der Y191F- und Y223F-Mutante konnte erstmals die Aktivierung des Rhodops-ins an zwei Schlüsselpositionen (Schiffsche Base und *ionic lock*) unterbunden werden. Dies kann durch eine zusätzliche Inkorporation der Y206F-Mutation weiter verstärkt werden, denn, wie hier gezeigt worden ist, Tyr206 beeinflusst durch seine Interaktionen mit dem TM3-TM5-Netzwerk ebenfalls das Meta I / Meta II-Gleichgewicht zu Gunsten der inaktiven Spezies. Dieses Gleichgewicht wird u.a. auch durch die Interaktionen von vier Methioninen auf der cytoplasmatischen Seite des Rezeptors aufrechterhalten. Diese separieren die cytoplasmatische Oberfläche von der Schiff-schen Base und verzögern dadurch die Deprotonierung der dieser Base.

## 4.2 Humanes Rhodopsin

Bei dieser Untersuchung galt es, den Aktivierungsmechanismus des huma-nen Rhodopsins mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie zu untersuchen. Bei der Gegenüberstellung der Spektren des humanen mit dem bovinen Rhodopsin lassen sich die Unterschiede sowohl zwischen den Photoprodukten als auch zwischen den Übergangswegen zu diesen Produkten erkennen. Die 23 unter-schiedlichen Aminosäuren führen jedoch dazu, dass sich die dunkeladaptierten Zustände der beiden Rezeptoren unterscheiden. Es sind also von Beginn an ungleiche Ausgangspositionen, von denen aus der Weg durch die energetische Landschaft zur aktiven Spezies gestartet wird.

### 4.2.1 Auswertung

**23 unterschiedliche Aminosäuren wirken sich auf alle Intermediate aus.** Bei den Temperaturen, unter denen Batho und Lumi stabilisiert werden, finden keine großen Bewegungen der Sekundärstrukturelemente statt. Die Verände-rungen, die in den ersten beiden Intermediaten reflektiert werden, beruhen hauptsächlich auf der veränderten Retinalgeometrie durch die *cis/trans*-Isomeri-sierung. Dies führt aber auch dazu, dass sich die Interaktionen zwischen dem Retinal und den umliegenden Aminosäuren (Bindungstasche) ebenfalls ändern, was durch entsprechende Banden im jeweiligen Differenzspektrum abgebildet



wird. So betrachtet, zeigen sowohl das Batho- als auch das Lumi-Spektrum des humanen Rhodopsins typische Differenzbanden, die man bereits vom bovinen Rhodopsin kennt. Einige Bandenpositionen und -intensitäten unterscheiden sich jedoch von der bovinen Referenz. Während beim Übergang zum ersten stabilisierbaren Intermediat die Diskrepanzen relativ klein sind, weichen die Übergänge zu den Lumi-Spezies deutlich stärker voneinander ab. Die Intensität der Banden im Amid-I-Bereich des  $\text{_{dd}}$ Spektrums hat ca. 60% der maximalen Intensität in den Grundzustand  $\rightarrow$  Lumi-Übergangsspektren des bovinen Rhodopsins. Das bedeutet einerseits, dass die Vorgänge in den Rezeptoren ähnlich sind, andererseits deuten die mit fortschreitendem Intermediat größer werdenden Unterschiede auf eine zunehmende Divergenz der Aktivierungsmechanismen hin. Hierfür sind nicht nur die verschiedenartigen Ausgangspositionen verantwortlich, sondern vielmehr die Situation in der direkten Umgebung der Schiff-schen Base.

**Meta I-Spezies zeigen die größten Unterschiede.** Während die frühen Intermediate nur marginale bis geringfügige Unterschiede zwischen den beiden Rezeptoren zeigten, ändert sich die Situation beim Übergang zur letzten inaktiven Spezies Meta I dramatisch. Die IR-Spektren differieren nahezu über den gesamten gemessenen Bereich. Die auffälligste Eigenschaft des humanen Meta I ist das Fehlen der Meta I-Markerbande, die beim bovinen Rhodopsin bei  $+1661\text{ cm}^{-1}$  auftritt. Diese Bande konnte bislang noch nicht eindeutig zugeordnet werden. Aufgrund ihrer Position zeigt sie jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit die Gesamtheit aller strukturellen Änderungen, die beim Übergang zum Meta I stattfinden. Folglich kann man postulieren, dass das Fehlen dieser Bande im humanen Meta I insgesamt weniger und/oder andere Konformationsänderungen beim humanen Rezeptor bedeutet. Die wichtigsten strukturellen Änderungen beim Übergang zum Meta I finden im Bereich der TM5 statt. Die Rezeptoren unterscheiden sich nicht nur in der Zusammensetzung dieser Helix, sondern viel mehr in der Übergangsregion des EL2 zur TM5. Zur Klärung des Sachverhalts, ob diese Region für die beobachteten Unterschiede verantwortlich ist, wurde eine Chimäre aus beiden Rhodopsinen erzeugt.

Die Suche nach der Ursache für die beobachteten Abweichungen bedarf einer genaueren Beschreibung der Vorgänge im Rezeptor, die mit der Bildung

dieses Intermediats assoziiert sind. Die Isomerisierung des Retinals und die thermische Relaxation über die ersten beiden Intermediate führen dazu, dass die Aufgabe des Gegenions der Schiffschens Base im Meta I nicht mehr von Glu113 alleine, sondern vom komplexen Gegenion, bestehend aus Glu113 und Glu181 übernommen wird. Dieser Wechsel wird mittels einer Reorganisation des Wasserstoffbrückennetzwerkes um die Schiffschens Base bewerkstelligt. Das betrifft unter anderem die Seitenreste des Ser186, Tyr191 und Tyr192. Des Weiteren induziert der schon bei den früheren Intermediaten einsetzende *toggle-switch* von Trp265 eine Rotation der sechsten TM [113]. Auf der anderen Seite der Bindungstasche wird das TM3-TM5-Netzwerk wegen der Wirkung, die der  $\beta$ -Iononring ausübt, ebenfalls gestört. Dies resultiert in einem Zerfall der stabilisierenden Wasserstoffbrücke zwischen Glu122 und His211 und der Bewegung der TM5. Es wurde bereits in anderen Studien gezeigt, dass bei der Bildung der aktiven Spezies die Bewegungen der TM5 und EL2 gekoppelt ablaufen [75]. An dieser Stelle wird nochmals postuliert, dass diese gekoppelten Bewegungen der beiden Sekundärstrukturelemente (TM5 und EL2) im bovinen Rhodopsin bereits beim Übergang zum Meta I stattfinden. Zum einen kann diese Bewegung aus der Meta I-Markerbande bei  $1661\text{ cm}^{-1}$  abgeleitet werden, zum anderen spricht die in dieser Arbeit durchgeführte Studie mit den bovinen Tyrosin-Mutanten ebenfalls dafür.

**Die human-bovinen Chimären unterstützen die Separation der Signalwege.** Die TEC-Chimäre ( $T_5E_2C$ -Region vom bovinen Rezeptor ( $_{194}PHE_{196}$ ) im humanen Wildtyp) zeigt, dass die fehlende Bande bei  $^{*}1661\text{ cm}^{-1}$  teilweise wiederhergestellt wird. Die dabei beobachtete Intensität beträgt ca. 35-40% des normalerweise im bovinen Meta I gemessenen Wertes. Daraus kann man ableiten, dass durch die starre Verbindung von TM5 und EL2 die gekoppelte Bewegung dieser Strukturelemente, wenn auch nur zum Teil, wiedererlangt wird und dass im humanen Rezeptor die Bewegungen von EL2 und TM5, zumindest beim Übergang zu Meta I, eher entkoppelt und sequenziell ablaufen.

Dennoch bleibt die Tatsache, dass nicht die gesamte Intensität der bovinen Spezies wiedererlangt wurde. Hierfür können solche Positionen verantwortlich gemacht werden, die sich in den Sekundärstrukturelementen befinden und die starken Positionsänderungen während der Aktivierung des Rezeptors unterlie-

gen. Dies betrifft insbesondere die Positionen 213, 216 und 218 in der TM5 (Abbildung 4.4, *blau* hinterlegt). Diese Positionen konnten leider nicht im Laufe der vorliegenden Arbeit untersucht werden, stellen aber trotzdem attraktive Anhaltspunkte für weitere Untersuchungen dar. So ist beispielsweise Isoleucin an Position 213 im bovinen Rezeptor durch das Threonin im humanen ersetzt worden. Es wurde gezeigt, dass die Threonine, gerade wenn sie ein Teil einer  $\alpha$ -helikalen Struktur sind, die Konformation dieser Struktur modulieren können und mit den Aminosäuren aus den oberhalb oder unterhalb liegenden Windungen interagieren können [170, 171]. Die Positionen 216 und 218 im humanen Rezeptor enthalten größere und voluminösere Aminosäuren als im bovinen Rhodopsin. So befindet sich ein Methionin anstelle eines Leucins an Position 216 und ein Isoleucin statt Valin an 218. Dies könnte beispielsweise dazu führen, dass die Interaktionen der fünften TM mit den benachbarten Helices im humanen Rhodopsin andersartig gestaltet sind als dies im bovinen Rhodopsin der Fall ist.

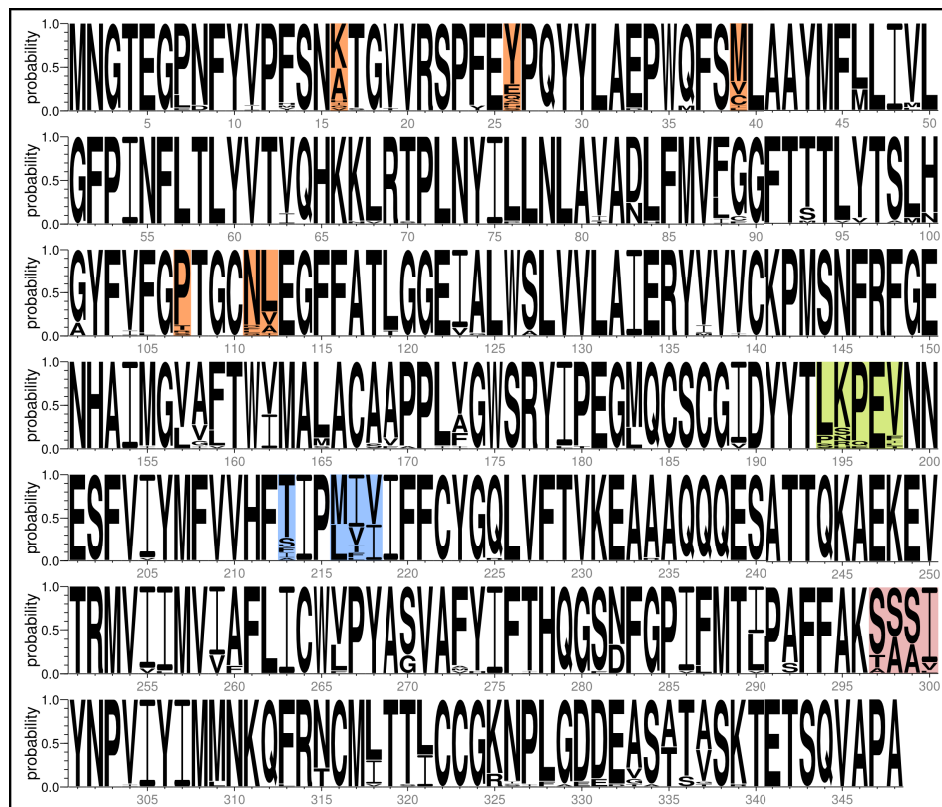


Abbildung 4.4: Alinierung aller z. Zt. vorhandenen Säuger-Rhodopsine

Die im Laufe dieser Dissertation näher beleuchteten Bereiche: T<sub>5</sub>E<sub>2</sub>C-Region (*grün* hinterlegt) und die Region zwischen der SB und NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motiv (*rosa* hinterlegt). Interessante Anhaltspunkte für eine weiterführende grundlagenbasierte Erforschung der Rhodopsine (*orange* hinterlegt), im Speziellen Positionen in der fünften Transmembranhelix (*blau* hinterlegt).

Weiterhin soll festgehalten werden, dass der maßgebliche Unterschied der beiden T<sub>5</sub>E<sub>2</sub>C-Regionen in der Position des Prolins besteht. Während es beim bovinen Rhodopsin an Position 194 vorzufinden ist, befindet es sich beim humanen Rhodopsin an Position 196. Prolin hat eine helixbrechende Eigenschaft, d.h. diese Aminosäure ist sehr oft an den Enden der  $\alpha$ -helikalen Strukturelemente vorzufinden bzw. führt das Vorkommen eines Prolins inmitten der helikalen Struktur zu einer Störung der Harmonie der Windungen an dieser Stelle und es wird ein Abknicken der Helix induziert. Beispiele hierfür sind Pro215 und Pro267 im Rhodopsin. Die Position des Prolins in der T<sub>5</sub>E<sub>2</sub>C-Region definiert möglicherweise die Flexibilität der Kopplung des EL2 an die TM5.

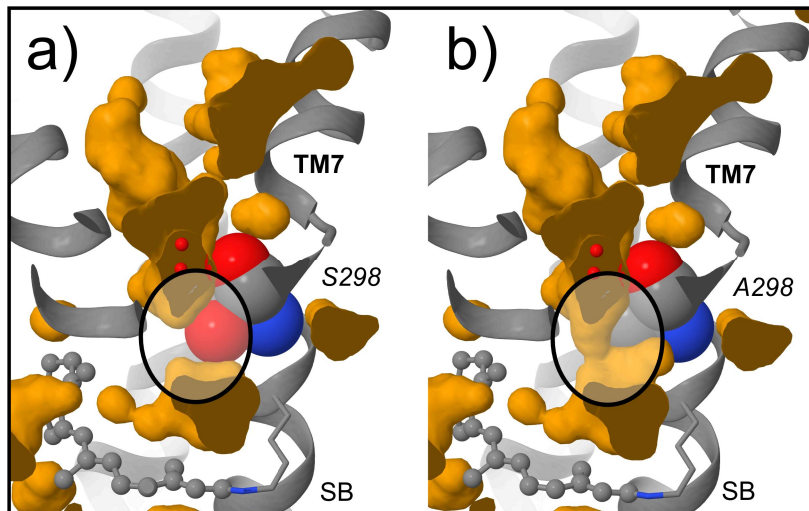
Bemerkenswert in diesem Vergleich (Abbildung 4.4) ist auch, dass alle Sequenzen, die eine vom humanen Rhodopsin abweichende Abfolge in dieser Region haben, entweder von nachtaktiven oder Meeressäugern stammen (siehe Anhang, Abbildung 6.1). Daraus kann geschlossen werden, dass die Modifikationen der sequenziellen Abfolge in dieser Region eine evolutionäre Anpassung an die unterschiedlichen Lebensräume und den damit einhergehenden unterschiedlichen Lichtbedingungen darstellt.

Ganz anders verhält sich die human-bovine Chimäre, bei der die vier an die Schiff'sche Base angrenzenden Aminosäuren aus dem bovinen Rhodopsin (<sub>297</sub>TSAV<sub>300</sub>) in den humanen Rezeptor eingesetzt worden sind (SB-Chimäre). Hier wurde festgestellt, dass die veränderte Umgebung der Schiff'schen Base keinen signifikanten Einfluss auf das Meta I / Meta II-Gleichgewicht des humanen Rhodopsins ausübt. Es sind jedoch die Schwingungen des Retinals betroffen. Hier verschiebt sich die negative Bande bei  $\sim 1237\text{ cm}^{-1}$  in Richtung der üblichen Frequenz des bovinen Rhodopsins bei  $\sim 1238\text{ cm}^{-1}$ . Die Gegenüberstellung aller vorhandenen Rhodopsinsequenzen der Mammalia deckt eine hohe Variabilität in diesem Bereich auf. Es werden aber nur drei bestimmte Aminosäuren in unterschiedlichen Kombinationen für die Gestaltung dieses Bereiches verwendet. Die Modulation der Absorption im infraroten Bereich des Spektrums durch die der Schiff'schen Base angrenzenden Aminosäuren wirkt sich höchstwahrscheinlich auch auf das Absorptionsmaximum im visuellen Bereich des Spektrums aus und verursacht die beobachteten Differenzen zwischen den Pigmenten.

**Molekulare Modellierung dient zum besseren Verständnis der molekularen Vorgänge.** Modellierungen und MD-Simulationen können zur strukturellen Interpretation der FTIR-Ergebnisse dienen [160]. Aus diesem Grund habe ich in Kooperation theoretische Methoden herangezogen. Diese theoretischen Berechnungen und Analysen wurden von Alexander Rose aus der AG Hilbrand durchgeführt. Seine Ergebnisse sollen nun im Folgenden dargestellt und diskutiert werden.

Als erstes ist das Homologiemodell auf den Grundlagen der bereits vorhandenen hochaufgelösten Kristallstrukturen des bovinen Rhodopsins im Grundzustand (pdb-id: 1U19 [96]) und in der aktiven Konformation (pdb-id.: 3PXO [82]) errechnet worden [172]. Auf diese Weise wurden künstliche Strukturen geschaffen, die einerseits zur besseren Visualisierung der internen Interaktionen verwendet werden können, andererseits als Ausgangspunkt für genauere und detaillierte molekular-dynamische Kalkulationen (MD-Simulation) dienen. Hier findet sich ein Beispiel der Aussagekraft solcher MD-Simulationen anhand der Kristallstruktur [173].

**SB-Umgebung des humanen Rhodopsin bietet mehr Raum.** Eine der Berechnungen betrifft das aus vier Seitenketten in der unmittelbaren Umgebung der Schiffschen Base (aa 297-300), bestehende Areal (siehe Abschnitt 1.6.1 und Abbildung 1.15). Den größten Unterschied stellt dabei die Position 298 dar (Abbildung 4.5): Im bovinen Rhodopsin ist an dieser Stelle die Aminosäure Serin vorzufinden, im humanen Rhodopsin dagegen die Aminosäure Alanin. Ausgehend von den van-der-Waals-Radien der besagten Seitenketten, werden die von den Aminosäuren eingenommenen atomaren Volumina berechnet [174]. Diese weisen eine Differenz von ca.  $5,47 \text{ \AA}^3$  auf, was im Falle des humanen Rhodopsins genügend Platz für ein zusätzliches Wassermolekül (modelliert als eine Sphäre mit dem Radius von  $1,2 \text{ \AA}$  und dementsprechend einem Volumen von  $5,43 \text{ \AA}^3$ ) bietet und/oder extra Raum für Bewegungen der festinkorporierten Wassermoleküle schafft. Des Weiteren zeigen die Berechnungen, dass die mutmaßlichen Wassertaschen (siehe Abschnitt 1.5.6) beim humanen Rhodopsin miteinander verbunden sind, während sie beim bovinen Rhodopsin durch die Seitenkette des Serins im Zusammenspiel mit Met86 und Trp265 voneinander separiert vorliegen (Abbildung 4.5a).



**Abbildung 4.5: Region um die Position 298**

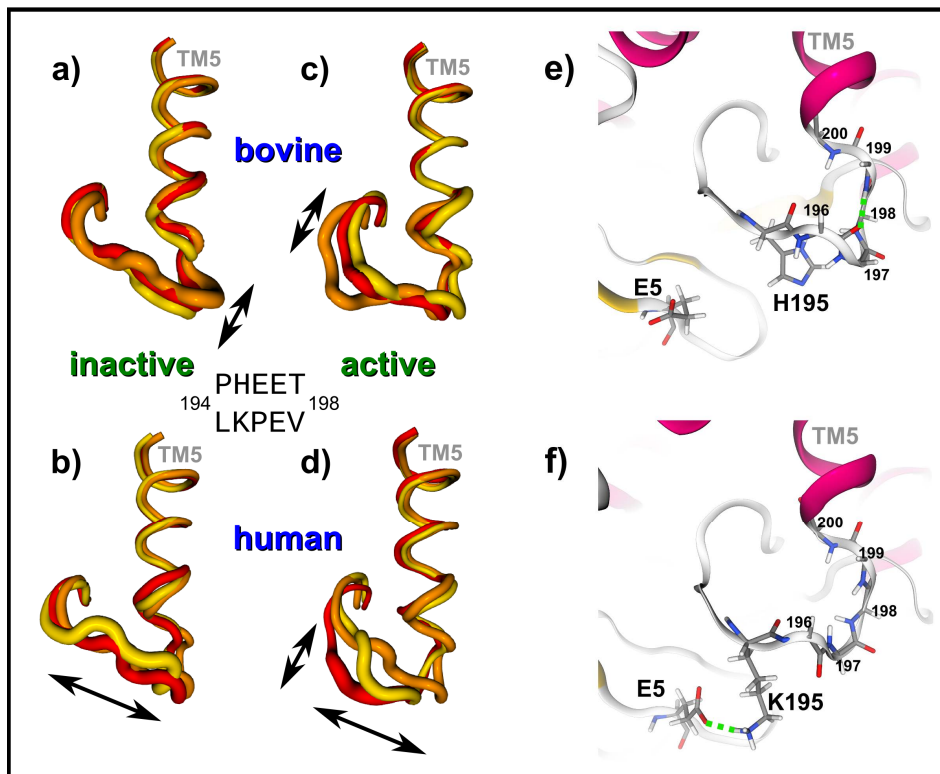
Vergleich der Bereiche um die Position 298 (*schwarz umkreist*) zwischen **a)** bovinem und **b)** humanem Rhodopsin. Der Einbau von Serin für Alanin führt zur Trennung der wassergefüllten Taschen (*orange Oberflächen*).

Das Zusammenspiel von zusätzlichem Wassermolekül, der Separation der Areale mit proteingebundenem Wasser und der daraus folgenden veränderten Beschaffenheit der Umgebung der Schiffsbasis, stellt möglicherweise die Ursache für die Abweichungen in den Deprotonierungskinetiken der Schiffsbasis bzw. in den Bildungskinetiken der aktiven Spezies dar (vgl. Abbildung 3.18).

**Die TEC-Region des humanen Rhodopsins ist deutlich flexibler.** Der zweite Schwerpunkt der theoretischen Berechnungen sind molekular-dynamischen Simulationen [175] der T<sub>5</sub>E<sub>2</sub>C-Region mit dem Ziel, die konformationelle Flexibilität der besagten Region sowohl bei der inaktiven als auch bei der aktiven Spezies zu untersuchen. Hierfür wurde für jedes System eine Clusteranalyse durchgeführt [175], bei der die EL2-Konformationen aus den MD-Simulationen zusammengefasst werden und jeweils drei repräsentative Konformationen dargestellt. Die Ausdehnung bzw. der Durchmesser der in Abbildung 4.6a-d gezeigten schematischen Sekundärstruktur dieses Fragments steht in direktem Bezug zu den Fluktuationen jeder Seitenkette im jeweiligen Cluster.

Die Simulationen des bovinen Rhodopsins zeigen lediglich eine flatternde Bewegung, die sich vom inaktiven zum aktiven Zustand nur in der Position der maximalen Ausprägung verlagert. Diese Bewegungen sind lokalisiert, ändern

sich kaum während der Aktivierung und suggerieren eine rigide Kopplung der TM5 an den EL2 sowohl im dunkeladaptierten als auch im belichteten Zustand. Das humane Rhodopsin zeigt hingegen eine ganz andere Dynamik: In der inaktiven Konformation wird eine gleitende Bewegung entlang der Ebene des  $\beta$ -Faltblatts beobachtet, in der aktiven kommt zu der gleitenden eine orthogonal flatternde Schwingung hinzu. Die Art der Bewegungen sowie die zusätzliche Bewegung im aktiven Zustand bedeutet eine höhere Flexibilität der T<sub>5</sub>E<sub>2</sub>C-Region im dunkeladaptierten Zustand sowie eine Zunahme der Flexibilität in der aktiven Konformation.



**Abbildung 4.6: Clusteranalyse der TEC-Region**

Konformationelle Flexibilität der Übergangsregion der fünften TM in den exoplasmatischen Loop 2 analysiert mittels molekular-dynamischen Simulationen vom bovinen (obere Reihe, **a**) und **c**) und humanen (untere Reihe **b**) und **d**) Rhodopsin in der inaktiven (linke Spalte, **a-b**) und der aktiven (mittlere Spalte, **c-d**) Konformation. Für jedes System sind drei, aus der Clusteranalyse gewonnene, repräsentative Konformationen (*rot, orange, gelb*) dargestellt. Die Dicke der Röhre ist mit den Fluktuationen der jeweiligen Seitenkette korreliert. **e-f**) Unterschiede in Wasserstoffbrücken der TEC-Regionen im Grundzustand (pdb-id: 1U19 [96]). **e**) Im bovinen Rhodopsin wird eine Wasserstoffbrücke zwischen den Grundgerüst-Sauerstoffen von E196 und T198 (*grüne gestrichelte Linie*) ausgebildet. **f**) Im humanen Rhodopsin besteht eine Wasserstoffbrücke zwischen den Seitenketten von E5 und K195 (*grüne gestrichelte Linie*).

**Die Spektren der aktiven Konformation reflektieren Unterschiede in den Dunkelzuständen.** Die Spektren der aktiven Spezies sowie des Komplexes aus der aktiven Spezies mit dem hochaffinen Peptid unterscheiden sich wie bei allen anderen Intermediaten untereinander. Die Unterschiede zwischen den jeweiligen Spektren vom humanem und bovinem Rhodopsin sind jedoch, auf die Gesamtintensität bezogen, relativ klein. Das bedeutet, dass die divergierenden Signalwege zur aktiven Spezies, mit der maximalen Divergenz im Meta I-Zustand, bei der Bildung der aktiven Spezies Meta II wieder konvergieren. Dafür sprechen auch die nahezu gleichen pKa-Werte des Meta I / Meta II-Gleichgewichts und die G-Protein-Aktivierungskinetiken. Durch die Komplexbildung aus aktivem Rhodopsin und CT $\alpha$ -Peptid wird ein Endzustand (Konformation) erzeugt, der bei beiden Rezeptoren fast identisch ist, wie die sehr ähnlichen *pbs*-Spektren zeigen. Diese Spektren bilden konformationelle Änderungen sowohl im Peptid als auch im Rezeptor ab [143]. Demzufolge können die Unterschiede, die zwischen den Komplexbildungsspektren (Meta II<sub>c</sub>) beider Rezeptoren beobachtet werden, aber auch die Unterschiede zwischen den Meta II-Spektren auf die unterschiedlichen Dunkelzustände zurückgeführt werden.

#### 4.2.2 Ovines Rhodopsin

Als Ergänzung der Studie über die Funktionsweise des humanen Rhodopsins wurde eine weitere, natürlich vorhandene Variante des Rhodopsins, nämlich das ovine Rhodopsin untersucht. Interessanterweise unterscheiden sich alle Intermediate des ovinen Rhodopsins sowohl von der humanen als auch von der bovinen Referenz. Im Übergangsspektrum zum Bathorhodopsin lässt sich sogar eine spezifische Bande bei 1507 cm<sup>-1</sup> feststellen. Die fingerprint-Bande des Retinals befindet sich jedoch an der gleichen Position wie beim bovinen Rhodopsin und bei der human-bovinen SB-Chimäre. Daraus kann man schlussfolgern, dass, zumindest im Falle der frühen Intermediate, die Beschaffenheit der Bindungstasche und die Umgebung der Schiffschen Base für diese Abweichungen verantwortlich gemacht werden kann. Die ovine SB-Umgebung unterscheidet sich in der Abfolge der Aminosäuren von den beiden Referenzrezeptoren. An Position 298 befindet sich jedoch mit Serin die gleiche Aminosäure wie im bovinen Rhodopsin. Die Spektren der späten Intermediate wie



Meta I und Meta II lassen sich trotz der höheren sequenziellen Homologie mit dem bovinen Rezeptor viel besser mit entsprechenden Spektren des humanen Rhodopsins vergleichen. Die Ursache hierfür ist die gleiche flexiblere Gestaltung der T<sub>5</sub>E<sub>2</sub>C-Region wie im humanen Rezeptor. Ein überraschendes Ergebnis haben die Messungen unter Meta II-favorisierenden Bedingungen geliefert. Im ovinen Rhodopsin entsteht neben den Meta II-typischen Banden eine Bande bei 1659 cm<sup>-1</sup>, die für das bovine Meta I spezifisch ist und im humanen Rhodopsin gänzlich vermisst wird. Die sequenziellen Abfolgen der Sekundärstrukturelemente, die während der Aktivierung die meisten Bewegungen vollführen (TM5, TM6 und EL2), sind beim ovinen und bovinen Rhodopsin mit zwei Ausnahmen nahezu identisch. Die erste Ausnahme betrifft die besagte T<sub>5</sub>E<sub>2</sub>C-Region, die zweite die Position 213. An dieser in der TM5 liegenden Position unterscheiden sich alle drei Rezeptoren. Während das ovine und humane Rhodopsin kleine polare Seitenketten enthalten (Serin bzw. Threonin), besitzt das bovine Rhodopsin dagegen eine voluminösere und hydrophobe Seitenkette (Isoleucin).

### 4.2.3 Schlussfolgerung

Der zuvor festgestellte signifikante Unterschied zwischen den Meta I-Intermediaten vom humanen und bovinen Rhodopsin bedeutet also, dass die bereits angesprochene Divergenz der Wege zur aktiven Spezies hier am größten ausgeprägt ist. Andererseits ist bekannt, dass die Konformationsänderungen, die durch die Isomerisierung des Retinals hervorgerufen werden, eine starke Zunahme in der Flexibilität der umliegenden Regionen nach sich ziehen [176]. Die vorgestellten Messergebnisse können dahingehend interpretiert werden, dass ausgehend von der höheren Flexibilität der T<sub>5</sub>E<sub>2</sub>C-Region beim humanen Rezeptor bereits im dunkeladaptierten Zustand (der sich wiederum von bovinen unterscheidet) weniger Konformationsänderungen notwendig sind, um die Schiff'sche Base erfolgreich deprotonieren zu können. Dies bedeutet jedoch gleichzeitig, dass die Deprotonierungsreaktion schneller abläuft, als dies der Fall bei einer eher starren T<sub>5</sub>E<sub>2</sub>C-Region wäre. Ein zusätzlicher Beitrag hierzu wird auch von der andersartig gestalteten Region zwischen der Schiff'schen Base und dem NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motiv geleistet. Diese unterschiedlichen Kinetiken stehen auch in Übereinstimmung mit den Beobachtungen, die mithilfe der ultraschnellen UV-Vis-Spektroskopie in der Arbeitsgruppe von David Kliger

gemacht worden sind: Im bovinen Rhodopsin existieren zwei grundlegend verschiedene Meta I-Spezies, jeweils mit einer protonierten und einer deprotonierten Schiffschen Base [158]. Diese Spezies entstehen auf unterschiedlichen Zeitskalen in parallel verlaufenden Reaktionswegen und in temperaturabhängiger Weise. Welchen der beiden Reaktionswege das Rhodopsin einschlägt wird maßgeblich vom TM3-TM5-Netzwerk gesteuert. Obwohl die theoretischen Berechnungen auf keine direkte Beeinflussung dieses Netzwerkes durch die Inkorporation der 23 Positionen in die bovine Sequenz hindeuten und die auffälligsten Abweichungen in den Sequenzen entweder oberhalb oder unterhalb dieses Netzwerkes liegen, kann an dieser Stelle angenommen werden, dass die gesteigerte Flexibilität der T<sub>5</sub>E<sub>2</sub>C-Region im Zusammenspiel mit der veränderten Umgebung der Schiffschen Base und die festgestellte Divergenz der Signalwege durch den Aktivierungsmechanismus, die sich schneller bildende Meta I-Spezies mit der deprotonierten Schiffschen Base auf Kosten der anderen bevorzugen. Diese Annahme findet auch Belege in den gemessenen Kinetiken der Entstehung der deprotonierten Spezies mit dem Absorptionsmaximum von 380 nm. Die zur Verfügung stehende zeitliche Auflösung erlaubt zwar keine konkrete Aussage in Bezug auf die in der Fachliteratur vorhandenen Zeitkonstanten, liefert aber einen Anhaltspunkt für weitere Experimente. Bei der Bildung der aktiven Spezies Meta II konvergieren diese Signalwege in den nahezu gleich gestalteten aktiven Zustand, welcher die nachfolgenden Proteine der Signaltransduktionskaskade bindet.

#### **4.2.4 Zusammenfassung**

Es wurden zwei Bereiche, in denen sich die beiden Rezeptoren sequenziell unterscheiden, gefunden und näher beleuchtet. Es konnte gezeigt werden, dass sich diese sequenziellen Unterschiede auf die Aktivierungsmechanismen der Rezeptoren auswirken. Erwartungsgemäß handelt es sich dabei um keine substanziellen Differenzen, sondern eher um Abweichungen, die organismusabhängige Feinjustierungen der Rezeptorfunktionen und Anpassungen an die spezifischen Lebensräume und Bedürfnisse darstellen. Dies konnte auch anhand der ergänzenden Studie mit dem ovinen Rhodopsin nochmals belegt werden.

Die durchgeführten Experimente mit den verwendeten Methoden und Techniken, aber auch die im Rahmen der Kooperationsarbeit gemachten theoretischen Berechnungen ergaben ebenfalls eine Vielzahl an Resultaten, aus den sich aber ein schlüssiges Gesamtbild der Funktionsweise des humanen Lichtrezeptors erschaffen lässt. Trotz des Umfangs der Studie stellt diese sicherlich nur den Anfang eines neuen Pfades in der grundlagenbasierten, aber auch in der praxisorientierten Erforschung der Arbeitsweise des Archetyps der GPCRs dar.



## 5 AUSBLICK

Im Laufe der vorliegenden Arbeit konnten zwei neuartige Aspekte im Aktivierungsmechanismus des bovinen Rhodopsins aufgedeckt werden. Als erstes wurde gezeigt, wie die Methionin-Seitenketten an der cytoplasmatischen Seite des Rezeptors miteinander interagieren und dadurch die genaue Abfolge der Konformationsänderungen steuern, die der Rezeptor auf dem Weg zum aktiven Zustand vollführt. Diese Erkenntnisse müssen in Hinblick auf die Interaktionen dieses Methionin-Clusters mit anderen Proteinen der Signaltransduktionskette, wie G-Protein und Arrestin, durch Komplexbildungsmessungen erweitert werden. Andererseits können die Studien am Rhodopsin selbst ausgeweitet und präzisiert werden. Dafür sind nicht zwangsläufig weitere Mutanten notwendig. Die hier verwendete Auswahl birgt schon jetzt großes Aussagepotential. Da der Methionin-Cluster hauptsächlich in den letzten Schritten der Aktivierungskaskade wirksam ist, muss zunächst der exakte Einfluss auf das Meta I / Meta II-Gleichgewicht mittels pH-Wert-Titration untersucht werden. Darüber hinaus eignet sich die FTIR-Spektroskopie hervorragend für Untersuchungen der Wechselwirkungen mit den Peptiden der besagten Proteine.

Der zweite Aspekt betrifft die Funktion der Tyrosin-Seitenketten sowie die Interaktionen zweier dieser Reste mit dem transienten Gegenion der Schiff-schen Base. Diese Interaktionen müssen sicherlich mit weiteren Methoden und Mutanten untermauert werden. Dazu bedarf es nicht nur näherer Untersuchungen, z.B. der Aufnahme und Abgabe des Retinals bei den hier verwendeten Mutanten, vielmehr muss die Mutantenpalette selbst erweitert werden. Für die Positionen 191 und 192 sind etwa solche Seitenketten denkbar, die in ähnlicher Weise wie das Tyrosin Wasserstoffbrücken zur Glutaminsäure bilden können (z.B. Arginin oder Lysin), aber auch solche Aminosäuren, die entweder nicht dazu in der Lage sind und/oder einen geringeren Platzbedarf haben. Die größten Erkenntnisse abseits der dieser Arbeit zugrundeliegenden Studie über die

Rolle des Tyrosins 223, lieferte die Identifikation zweier weiterer Tyrosine, die das Meta I / Meta II-Gleichgewicht auf die Seite der inaktiven Spezies verlagern. Die Tyrosine 191 und 223 wurden kombiniert, um eine Verstärkung dieses Effekts zu erzeugen. Dabei ist durchaus bemerkenswert, dass es sich stets um Tyrosine handelt, die einen derartigen Einfluss auf die Bildung der aktiven Spezies auszuüben vermögen, was schließlich interessante Möglichkeiten, insbesondere für die Kristallografie, eröffnet, denn eine Kristallstruktur des Meta I-Intermediats konnte bisher nicht realisiert werden. Während die Funktionen, die die Tyrosine 191 und 192 ausüben, für das Rhodopsin spezifisch zu sein scheinen, können die Erkenntnisse aus der Studie an Tyrosin 206 auch für andere GPCRs verwendet werden, um Zustände verschiedener Affinität gegenüber dem G-Protein sowie die Mechanismen der Signalübertragung vom Liganden zur G-Protein-bindenden Domäne besser verstehen zu können.

Die Tragweite der aus der Studie mit dem humanen Rezeptor gewonnenen Resultate ist nur schwer abschätzbar. Trotz des Studiumumfangs und der Zahl der verwendeten Methoden ist das Spektrum der wissenschaftlichen Möglichkeiten noch bei Weitem nicht ausgeschöpft, was natürlich nur das humane Rhodopsin als Untersuchungsobjekt betrifft. Ein besonderes Augenmerk sollte hierbei auf die drei in der fünften Helix lokalisierten Positionen gelegt werden, in denen sich humanes und bovines Rhodopsin unterscheiden, nicht zuletzt, weil eine dieser Positionen offensichtlich Ursache für *Retinitis pigmentosa* ist und ein Einfluss auf den Aktivierungsmechanismus vermutet werden kann. Die Komplementierung des Gesamtbildes erfordert eine Vielzahl an Experimenten, die zum Standardprogramm beim bovinem Rezeptor gehören. Berücksichtigt man die Auswirkungen, die die vorliegenden Ergebnisse auch auf Studien haben können, die die Ursachen der direkt mit dem Rezeptor verbundenen Krankheiten erforschen, sollte als ein weiteres Vorhaben auch die Charakterisierung des murinen Rhodopsins nach dem in dieser Arbeit vorgestellten Prinzip vorgenommen werden, denn Mäuse sind die bevorzugten Untersuchungsobjekte bei physiologischen Studien. Als übergeordnetes Ziel steht jedoch weiterhin ein genaueres Verständnis der Vorgänge im Rezeptor an sich sowie der Reaktionsmechanismen mit anderen Proteinen der Signaltransduktionskaskade – Untersuchungen der vorhandenen natürlichen Varianten des Rezeptors sind dabei unumgänglich.







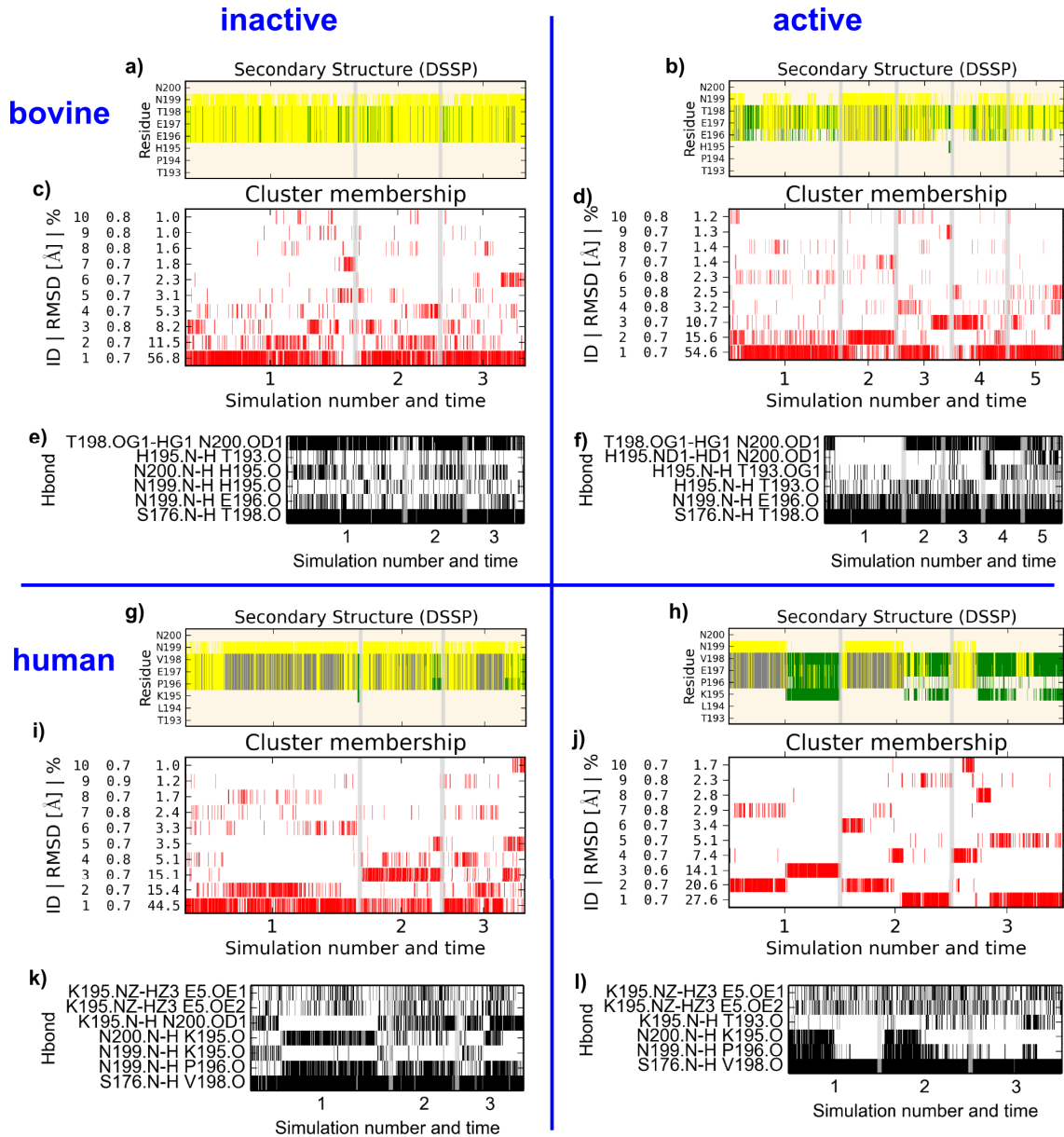
## 6 ANHANG

	190	195	200	294	299	304
Cattle ( <i>Bos Taurus</i> )	DYYT	PHE	ETNN	FAKTSA	VYNPV	
Saddleback dolphin ( <i>Delphinus delphis</i> )	DYYT	LSPE	VNN	FAKSSS	IYNPV	
Long-finned pilot whale ( <i>Globicephala melas</i> )	DYYT	SRQ	EVNN	FAKSSS	IYNPV	
Sowerby's beaked whale ( <i>Mesoplodon bidens</i> )	DYYT	PSPE	VNN	FAKSSA	IYNPV	
Atlantic bottle-nosed dolphin ( <i>Tursiops truncatus</i> )	DYYT	SRQ	EVNN	FAKSSS	IYNPV	
North Atlantic right whale ( <i>Eubalaena glacialis</i> )	DYYT	LSPE	VNN	FAKSSS	IYNPV	
Thirteen-lined ground squirrel ( <i>Spermophilus tridecemlineatus</i> )	DYYT	PKPE	LNN	FAKSSA	LYNPV	
Guinea pig ( <i>Cavia porcellus</i> )	DYYT	LKPE	VNN	FAKSSS	IYNPV	
Northern white-cheeked gibbon ( <i>Nomascus leucogenys</i> )	DYYT	LKPE	VNN	FAKSAA	IYNPV	
Tasmanian devil ( <i>Sarcophilus harrisii</i> )	DYYT	LNPE	FNN	FAKSSS	IYNPV	
Gray short-tailed opossum ( <i>Monodelphis domestica</i> )	DYYT	LKPE	VNN	FAKSSS	VYNPV	
Chimpanzee ( <i>Pan troglodytes</i> )	DYYT	LKPE	VNN	FAKSAA	IYNPV	
Sumatran orangutan ( <i>Pongo abelii</i> )	DYYT	LKPE	VNN	FAKSAA	IYNPV	
Small-eared galago ( <i>Otolemur garnettii</i> )	DYYT	LKPE	VNN	FAKTAS	IYNPV	
White-tufted-ear marmoset ( <i>Callithrix jacchus</i> )	DYYT	LKPE	VNN	FAKSAA	IYNPV	
Giant panda ( <i>Ailuropoda melanoleuca</i> )	DYYT	LKPE	VNN	FAKSSS	IYNPV	
Macaca mulatta ( <i>Rhesus macaque</i> )	DYYT	LKPE	VNN	FAKSAS	IYNPV	
Caribbean manatee ( <i>Trichechus manatus</i> )	DYYT	LKPE	VNN	FAKSAS	IYNPV	
Fat-tailed dunnart ( <i>Sminthopsis crassicaudata</i> )	DYYT	LNPE	FNN	FAKSSS	IYNPV	
Rat ( <i>Rattus norvegicus</i> )	DYYT	LKPE	VNN	FAKTAS	IYNPV	
Rabbit ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	DYYT	LKPE	VNN	FAKSSS	IYNPV	
Pig ( <i>Sus scrofa</i> )	DYYT	LKPE	VNN	FAKSAS	IYNPV	
Harbor seal ( <i>Phoca vitulina</i> )	DYYT	LKPE	VNN	FAKAAAS	IYNPV	
Harp seal ( <i>Pagophilus groenlandicus</i> )	DYYT	LKPE	VNN	FAKAAA	IYNPV	
Greater galago ( <i>Otolemur crassicaudatus</i> )	DYYT	LKPE	VNN	FAKTAS	IYNPV	
Mouse ( <i>Mus musculus</i> )	DYYT	LKPE	VNN	FAKSSS	IYNPV	
Crab-eating macaque ( <i>Macaca fascicularis</i> )	DYYT	LKPE	VNN	FAKSAS	IYNPV	
African elephant ( <i>Loxodonta africana</i> )	DYYT	LKPE	VNN	FAKSSA	IYNPV	
Human ( <i>Homo sapiens</i> )	DYYT	LKPE	VNN	FAKSAA	IYNPV	
Cat ( <i>Felis catus</i> )	DYYT	LKPE	VNN	FAKSSS	IYNPV	
Chinese hamster ( <i>Cricetulus griseus</i> )	DYYT	LKPE	VNN	FAKSSS	IYNPV	
Dog ( <i>Canis familiaris</i> )	DYYT	LKPE	I NN	FAKSSS	IYNPV	
Bare-tailed woolly opossum ( <i>Caluromys philander</i> )	DYYT	LKPE	VNN	FAKTSA	VYNPV	

Abbildung 6.1: Alinierung der Rhodopsinsequenzen

Zwei Bereiche aus der Zusammenstellung aller verfügbaren Sequenzen der Säugetier-Rhodopsine, entnommen der Online-Datenbank ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). Als erstes wird der Bereich um die T<sub>5</sub>E<sub>2</sub>C-Region angezeigt. Der zweite Ausschnitt stellt die Region zwischen der Schiffchen Base und dem NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motiv dar. Die Farbgebung der Aminosäuren erfolgt nach dem standardmäßigen Farbschema des Alinierungsprogramms *ClustalX*. Die in dieser Arbeit genauer untersuchten und diskutierten Bereiche sind *blau* umrandet. Diese Ausschnitte dienen als Grundlage für die *WebLogo*-Darstellungen in den Abbildungen 1.14 und 1.15.





**Abbildung 6.2: Sekundärstruktur, Clusteranalyse und Wasserstoffbrücken der TEC-Region in den MD-Simulationen**

**a, b, g, h)** Vergleichende Analyse der Sekundärstruktur mittels DSSP [177] vom bovinen und humanen Rhodopsin zeigt Unterschiede in der Zusammensetzung der Strukturelemente. Im der bovinen TEC-Region überwiegen die turn-Strukturen (*gelb*) während im humanen Rezeptor  $\beta$ -Strukturen (*grün*) und  $3_{10}$ -helikale-Strukturen (*grau*) vorherrschend sind. **c, d, i, j)** Die Clusteranalyse zeigt hohe Homogenität für das inactive/aktive bovine und humane Rhodopsin. Die drei größten Cluster beinhalten 76,5% (bovine inactive), 80,9% (bovine aktive), 75,0% (human inactive) und 62,3% (human aktive) der gruppierten Strukturen. **e, f, k, l)** Wasserstoffbrücken zwischen den TEC-Regionen und den umliegenden Seitenketten. Im humanen Rhodopsin ist eine mögliche Wasserstoffbrücke zwischen Glu5 und His195 beobachtet worden. Diese hat kein Bestand im bovinen Rezeptor. Stattdessen wird hier eine Wasserstoffbrücke zwischen Grundgerüstatom von Pro196 und Val198 beobachtet, während im aktiven humanen Rezeptor diese Interaktion wahrscheinlich verloren geht. Die Analyse der Wasserstoffbrücken wurde mit dem GROMACS-Werkzeug *g\_hbond* mit folgenden Einstellungen durchgeführt: maximaler Winkel zwischen Donor- und Akzeptor-Wasserstoff  $30^\circ$  mit maximaler Distanz von  $3,6 \text{ \AA}$ . (Analyse und Darstellung von Alexander Rose, verändert).



## 7 LISTE DER VERÖFFENTLICHUNGEN

M. Elgeti\*, R. Kazmin\*, M. Heck, T. Morizumi, E. Ritter, P. Scheerer, O.P. Ernst, F. Siebert, K.P. Hofmann, F.J. Bartl, *Conserved Tyr223(558) plays different roles in the activation and G-protein interaction of rhodopsin*, J. Am. Chem. Soc., 133 (2011) 7159–65. doi: 10.1021/ja200545n

M. Szczepek, F. Beyrière, K.P. Hofmann, M. Elgeti, R. Kazmin, A. Rose, F.J. Bartl, D. von Stetten, M. Heck, M.E. Sommer, P.W. Hildebrand, P. Scheerer, *Crystal structure of a common GPCR-binding interface for G protein and arrestin*, Na. Commun., 5 (2014) 4801. doi: 10.1038/ncomms5801

M. Elgeti, R. Kazmin, A. Rose, M. Szczepek, F.J. Bartl, P.W. Hildebrand, P. Scheerer, K.P. Hofmann, *Diversity of interactions between Rhodopsin and the Arrestin-1 finger loop*. (2015) (in submission process)

R. Kazmin, A. Rose\*, M. Szczepek\*, M. Elgeti, E. Ritter, R. Piechnick, K.P. Hofmann, P. Scheerer, P.W. Hildebrand, F.J. Bartl, *The activation pathway of human rhodopsin in comparison to bovine rhodopsin*, J. Biol. Chem. (2015) (submitted 03.2015)

---

\* gleichberechtigte Autorenschaft



## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R.W. Rodieck, *The first steps in seeing*, Sinauer Associated, Inc., Sunderland, Massachusetts, n.d.
- [2] S.L. Merbs, J. Nathans, *Absorption spectra of human cone pigments.*, Nature. 356 (1992) 433–5. doi:10.1038/356433a0.
- [3] D.D. Oprian, A.B. Asenjo, N. Lee, S.L. Pelletier, *Design, chemical synthesis, and expression of genes for the three human color vision pigments.*, Biochemistry. 30 (1991) 11367–72.
- [4] D.M. Rosenbaum, S.G.F. Rasmussen, B.K. Kobilka, *The structure and function of G-protein-coupled receptors.*, Nature. 459 (2009) 356–63. doi:10.1038/nature08144.
- [5] S.O. Smith, *Structure and activation of the visual pigment rhodopsin.*, Annu. Rev. Biophys. 39 (2010) 309–28. doi:10.1146/annurev-biophys-101209-104901.
- [6] M. Chabre, *Trigger and amplification mechanisms in visual phototransduction.*, Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 14 (1985) 331–60. doi:10.1146/annurev.bb.14.060185.001555.
- [7] M. Elgeti, R. Kazmin, M. Heck, T. Morizumi, E. Ritter, P. Scheerer, O.P. Ernst, F. Siebert, K.P. Hofmann, F.J. Bartl, *Conserved Tyr223(5.58) plays different roles in the activation and G-protein interaction of rhodopsin.*, J. Am. Chem. Soc. 133 (2011) 7159–65. doi:10.1021/ja200545n.
- [8] R. HUBBARD, G. WALD, *Cis-trans isomers of vitamin A and retinene in vision.*, Science. 115 (1952) Unknown.
- [9] J.K. Wang, J.H. McDowell, P.A. Hargrave, *Site of attachment of 11-cis-retinal in bovine rhodopsin.*, Biochemistry. 19 (1980) 5111–7.
- [10] R.A. MORTON, G.A. PITT, *Studies on rhodopsin. IX. pH and the hydrolysis of indicator yellow.*, Biochem. J. 59 (1955) 128–34.
- [11] A. Kropf, R. Hubbard, *THE MECHANISM OF BLEACHING RHODOPSIN*, Ann. N. Y. Acad. Sci. 74 (1958) 266–280. doi:10.1111/j.1749-6632.1958.tb39550.x.
- [12] E.W. Abrahamson, C. Baumann, C.D.B. Bridges, F. Crescitelli, H.J.A. Dartnall, R.M. Eakin, G. Falk, P. Fatt, T.H. Goldsmith, R. Hara et al., *Photochemistry of Vision*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1972. doi:10.1007/978-3-642-65066-6.
- [13] B.S.W. Chang, K. Jönsson, M. a Kazmi, M.J. Donoghue, T.P. Sakmar, *Recreating a functional ancestral archosaur visual pigment.*, Mol. Biol. Evol. 19 (2002) 1483–9.
- [14] E.W. Abrahamson, S.E. Ostroy, *The photochemical and macromolecular aspects of vision*, Prog. Biophys. Mol. Biol. 17 (1967) 179–215. doi:10.1016/0079-6107(67)90007-7.
- [15] T. Rosenfeld, A. Alchalel, M. Ottolenghi, *Triplet states and cis-trans photoisomerization processes in the Schiff bases of retinal isomers.*, Photochem. Photobiol. 20 (1974) 121–5.
- [16] G. WALD, P.K. BROWN, *The molar extinction of rhodopsin.*, J. Gen. Physiol. 37 (1953) 189–200.
- [17] R.W. Schoenlein, L.A. Peteanu, R.A. Mathies, C. V Shank, *The first step in vision: femtosecond isomerization of rhodopsin.*, Science. 254 (1991) 412–5.
- [18] S. Hahn, G. Stock, *Quantum-Mechanical Modeling of the Femtosecond Isomerization in Rhodopsin*, J. Phys. Chem. B. 104 (2000) 1146–1149. doi:10.1021/jp992939g.
- [19] F. Siebert, *Application of FTIR spectroscopy to the investigation of dark structures and photoreactions of visual pigments*, Isr. J. Chem. 35 (1995) 309–323. doi:10.1002/ijch.199500033.

- [20] R.G. Matthews, R. Hubbard, P.K. Brown, G. Wald, *Tautomeric Forms of Metarhodopsin*, J Gen Physiol. 47 (1963) 215–40.
- [21] S. Arnis, K.P. Hofmann, *Two different forms of metarhodopsin II: Schiff base deprotonation precedes proton uptake and signaling state.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90 (1993) 7849–53.
- [22] K. Fahmy, T.P. Sakmar, F. Siebert, *Transducin-dependent protonation of glutamic acid 134 in rhodopsin.*, Biochemistry. 39 (2000) 10607–12. doi:10.1021/bi000912d.
- [23] M. Mahalingam, K. Martínez-Mayorga, M.F. Brown, R. Vogel, *Two protonation switches control rhodopsin activation in membranes.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105 (2008) 17795–17800. doi:10.1073/pnas.0804541105.
- [24] E. Zaitseva, M.F. Brown, R. Vogel, *Sequential rearrangement of interhelical networks upon rhodopsin activation in membranes: The meta IIa conformational substate*, J. Am. Chem. Soc. 132 (2010) 4815–4821. doi:10.1021/ja910317a.
- [25] C. Altenbach, K. Yang, D.L. Farrens, Z.T. Farahbakhsh, H.G. Khorana, W.L. Hubbell, *Structural features and light-dependent changes in the cytoplasmic interhelical E-F loop region of rhodopsin: a site-directed spin-labeling study.*, Biochemistry. 35 (1996) 12470–8. doi:10.1021/bi960849l.
- [26] S. Arnis, K. Fahmy, K.P. Hofmann, T.P. Sakmar, *A conserved carboxylic acid group mediates light-dependent proton uptake and signaling by rhodopsin.*, J. Biol. Chem. 269 (1994) 23879–81.
- [27] B. Knierim, K.P. Hofmann, O.P. Ernst, W.L. Hubbell, *Sequence of late molecular events in the activation of rhodopsin.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104 (2007) 20290–5. doi:10.1073/pnas.0710393104.
- [28] R. Vogel, M. Mahalingam, S. Lücke, T. Huber, F. Siebert, T.P. Sakmar, *Functional role of the “ionic lock”—an interhelical hydrogen-bond network in family A heptahelical receptors.*, J. Mol. Biol. 380 (2008) 648–55. doi:10.1016/j.jmb.2008.05.022.
- [29] K.P. Hofmann, O.P. Ernst, *[To see from light—biophysics of visual signal transduction]*, Z. Med. Phys. 11 (2001) 217–25.
- [30] R. Strotmann, K. Schröck, I. Bösel, C. Stäubert, A. Russ, T. Schöneberg, *Evolution of GPCR: change and continuity.*, Mol. Cell. Endocrinol. 331 (2011) 170–8. doi:10.1016/j.mce.2010.07.012.
- [31] L. Birnbaumer, J. Abramowitz, A.M. Brown, *Receptor-effector coupling by G proteins*, Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr. 1031 (1990) 163–224. doi:10.1016/0304-4157(90)90007-Y.
- [32] B.K. Fung, J.B. Hurley, L. Stryer, *Flow of information in the light-triggered cyclic nucleotide cascade of vision.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78 (1981) 152–6.
- [33] M.C. Lagerström, H.B. Schiöth, *Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery.*, Nat. Rev. Drug Discov. 7 (2008) 339–57. doi:10.1038/nrd2518.
- [34] R. Herrmann, M. Heck, P. Henklein, C. Kleuss, K.P. Hofmann, O.P. Ernst, *Sequence of interactions in receptor-G protein coupling.*, J. Biol. Chem. 279 (2004) 24283–90. doi:10.1074/jbc.M311166200.
- [35] R. Herrmann, M. Heck, P. Henklein, C. Kleuss, V. Wray, K.P. Hofmann, O.P. Ernst, *Rhodopsin-transducin coupling: role of the Galpha C-terminus in nucleotide exchange catalysis.*, Vision Res. 46 (2006) 4582–93. doi:10.1016/j.visres.2006.07.027.
- [36] O.G. Kisselev, C.K. Meyer, M. Heck, O.P. Ernst, K.P. Hofmann, *Signal transfer from rhodopsin to the G-protein: Evidence for a two-site sequential fit mechanism*, Proc. Natl. Acad. Sci. 96 (1999) 4898–4903. doi:10.1073/pnas.96.9.4898.
- [37] M. Heck, K.P. Hofmann, *Maximal rate and nucleotide dependence of rhodopsin-catalyzed transducin activation: initial rate analysis based on a double displacement mechanism.*, J. Biol. Chem. 276 (2001) 10000–9. doi:10.1074/jbc.M009475200.



- [38] M. Kahlert, K.P. Hofmann, *Reaction rate and collisional efficiency of the rhodopsin-transducin system in intact retinal rods.*, Biophys. J. 59 (1991) 375–86. doi:10.1016/S0006-3495(91)82231-7.
- [39] I.B. Leskov, V.A. Klenchin, J.W. Handy, G.G. Whitlock, V.I. Govardovskii, M.D. Bownds, T.D. Lamb, E.N. Pugh, V.Y. Arshavsky, *The gain of rod phototransduction: reconciliation of biochemical and electrophysiological measurements.*, Neuron. 27 (2000) 525–537. doi:10.1016/S0896-6273(00)00063-5.
- [40] L. Lagnado, D. Baylor, *Signal flow in visual transduction*, Neuron. 8 (1992) 995–1002. doi:10.1016/0896-6273(92)90122-T.
- [41] P.A. Hargrave, J.H. McDowell, D.R. Curtis, J.K. Wang, E. Juszczak, S.-L. Fong, J.K. Mohana Rao, P. Argos, *The structure of bovine rhodopsin*, Biophys. Struct. Mech. 9 (1983) 235–244. doi:10.1007/BF00535659.
- [42] Y.A. Ovchinnikov, N.G. Abdulaev, A.S. Bogachuk, *Two adjacent cysteine residues in the C-terminal cytoplasmic fragment of bovine rhodopsin are palmitoylated*, FEBS Lett. 230 (1988) 1–5. doi:10.1016/0014-5793(88)80628-8.
- [43] Z. Ablonczy, M. Kono, D.R. Knapp, R.K. Crouch, *Palmitoylation of cone opsins.*, Vision Res. 46 (2006) 4493–501. doi:10.1016/j.visres.2006.08.003.
- [44] R.G. Huber, M. a Margreiter, J.E. Fuchs, S. von Grafenstein, C.S. Tautermann, K.R. Liedl, T. Fox, *Heteroaromatic  $\pi$ -stacking energy landscapes.*, J. Chem. Inf. Model. 54 (2014) 1371–9. doi:10.1021/ci500183u.
- [45] P.B. Crowley, A. Golovin, *Cation- $\pi$  interactions in protein-protein interfaces.*, Proteins. 59 (2005) 231–9. doi:10.1002/prot.20417.
- [46] G.B. McGaughey, M. Gagné, A.K. Rappé,  *$\pi$ -Stacking interactions. Alive and well in proteins.*, J. Biol. Chem. 273 (1998) 15458–63.
- [47] S.S. Karnik, T.P. Sakmar, H.B. Chen, H.G. Khorana, *Cysteine residues 110 and 187 are essential for the formation of correct structure in bovine rhodopsin.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85 (1988) 8459–63.
- [48] A.J. Rader, G. Anderson, B. Isin, H.G. Khorana, I. Bahar, J. Klein-Seetharaman, *Identification of core amino acids stabilizing rhodopsin.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101 (2004) 7246–51. doi:10.1073/pnas.0401429101.
- [49] R. Nygaard, T.M. Frimurer, B. Holst, M.M. Rosenkilde, T.W. Schwartz, *Ligand binding and micro-switches in 7TM receptor structures.*, Trends Pharmacol. Sci. 30 (2009) 249–59. doi:10.1016/j.tips.2009.02.006.
- [50] P.W. Hildebrand, P. Scheerer, J.H. Park, H.W. Choe, R. Piechnick, O.P. Ernst, K.P. Hofmann, M. Heck, *A ligand channel through the G protein coupled receptor opsin*, PLoS One. 4 (2009) e4382 ST – A ligand channel through the G protein. doi:10.1371/journal.pone.0004382.
- [51] R. Piechnick, E. Ritter, P.W. Hildebrand, O.P. Ernst, P. Scheerer, K.P. Hofmann, M. Heck, *Effect of channel mutations on the uptake and release of the retinal ligand in opsin.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109 (2012) 5247–52. doi:10.1073/pnas.1117268109.
- [52] T.P. Sakmar, R.R. Franke, H.G. Khorana, *The role of the retinylidene Schiff base counterion in rhodopsin in determining wavelength absorbance and Schiff base pKa.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88 (1991) 3079–83.
- [53] T.P. Sakmar, R.R. Franke, H.G. Khorana, *Glutamic acid-113 serves as the retinylidene Schiff base counterion in bovine rhodopsin.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86 (1989) 8309–13.
- [54] F. Jaeger, K. Fahmy, T.P. Sakmar, F. Siebert, *Identification of Glutamic Acid 113 as the Schiff Base Proton Acceptor in the Metarhodopsin II Photointermediate of Rhodopsin*, Biochemistry. 33 (1994) 10878–10882. doi:10.1021/bi00202a005.
- [55] S. Jäger, J.W. Lewis, T.A. Zvyaga, I. Szundi, T.P. Sakmar, D.S. Kliger, *Time-resolved spectroscopy of the early photolysis intermediates of rhodopsin Schiff base counterion mutants.*, Biochemistry. 36 (1997) 1999–2009. doi:10.1021/bi962320u.

- [56] K. Fahmy, F. Siebert, T.P. Sakmar, *A mutant rhodopsin photoproduct with a protonated Schiff base displays an active-state conformation: a Fourier-transform infrared spectroscopy study.*, *Biochemistry*. 33 (1994) 13700–5.
- [57] S. Lüdeke, M. Beck, E.C.Y. Yan, T.P. Sakmar, F. Siebert, R. Vogel, *The role of Glu181 in the photoactivation of rhodopsin.*, *J. Mol. Biol.* 353 (2005) 345–56. doi:10.1016/j.jmb.2005.08.039.
- [58] J. Standfuss, E. Zaitseva, M. Mahalingam, R. Vogel, *Structural impact of the E113Q counterion mutation on the activation and deactivation pathways of the G protein-coupled receptor rhodopsin.*, *J. Mol. Biol.* 380 (2008) 145–57. doi:10.1016/j.jmb.2008.04.055.
- [59] E.C.Y. Yan, M.A. Kazmi, Z. Ganim, J.-M.M. Hou, D. Pan, B.S.W. Chang, T.P. Sakmar, R.A. Mathies, *Retinal counterion switch in the photoactivation of the G protein-coupled receptor rhodopsin*, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100 (2003) 9262–7 ST – Retinal counterion switch in the phot. doi:10.1073/pnas.1531970100.
- [60] M. Beck, T.P. Sakmar, F. Siebert, *Spectroscopic evidence for interaction between transmembrane helices 3 and 5 in rhodopsin.*, *Biochemistry*. 37 (1998) 7630–9. doi:10.1021/bi9801560.
- [61] C.J. Weitz, J. Nathans, *Histidine residues regulate the transition of photoexcited rhodopsin to its active conformation, metarhodopsin II*, *Neuron*. 8 (1992) 465–472. doi:10.1016/0896-6273(92)90274-H.
- [62] A.B. Patel, E. Crocker, P.J. Reeves, E. V Getmanova, M. Eilers, H.G. Khorana, S.O. Smith, *Changes in interhelical hydrogen bonding upon rhodopsin activation.*, *J. Mol. Biol.* 347 (2005) 803–12. doi:10.1016/j.jmb.2005.01.069.
- [63] P. Rath, L.L.J. DeCaluwe, P.H.M. Bovee-Geurts, W.J. DeGrip, K.J. Rothschild, *Fourier transform infrared difference spectroscopy of rhodopsin mutants: Light activation of rhodopsin causes hydrogen-bonding change in residue aspartic acid-83 during meta II formation*, *Biochemistry*. 32 (1993) 10277–10282. doi:10.1021/bi00090a001.
- [64] K. Fahmy, F. Jäger, M. Beck, T.A. Zvyaga, T.P. Sakmar, F. Siebert, *Protonation states of membrane-embedded carboxylic acid groups in rhodopsin and metarhodopsin II: a Fourier-transform infrared spectroscopy study of site-directed mutants.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 10206–10.
- [65] J. Isele, T.P. Sakmar, F. Siebert, *Rhodopsin activation affects the environment of specific neighboring phospholipids: an FTIR spectroscopic study.*, *Biophys. J.* 79 (2000) 3063–71. doi:10.1016/S0006-3495(00)76541-6.
- [66] C.K. Meyer, M. Bohme, A. Ockenfels, W. Gartner, K.P. Hofmann, O.P. Ernst, *Signaling states of rhodopsin. Retinal provides a scaffold for activating proton transfer switches.*, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 19713–8. doi:10.1074/jbc.M000603200.
- [67] M. Aguilà, D. Toledo, M. Morillo, M. Dominguez, B. Vaz, R. Alvarez, A.R. de Lera, P. Garriga, *Structural coupling of 11-cis-7-methyl-retinal and amino acids at the ligand binding pocket of rhodopsin.*, *Photochem. Photobiol.* 85 (2009) 485–93. doi:10.1111/j.1751-1097.2009.00535.x.
- [68] V. Hornak, S. Ahuja, M. Eilers, J.A. Goncalves, M. Sheves, P.J. Reeves, S.O. Smith, *Light activation of rhodopsin: insights from molecular dynamics simulations guided by solid-state NMR distance restraints.*, *J. Mol. Biol.* 396 (2010) 510–27. doi:10.1016/j.jmb.2009.12.003.
- [69] A.B. Patel, E. Crocker, M. Eilers, A. Hirshfeld, M. Sheves, S.O. Smith, *Coupling of retinal isomerization to the activation of rhodopsin.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 10048–53. doi:10.1073/pnas.0402848101.
- [70] T.P. Sakmar, *Structure of rhodopsin and the superfamily of seven-helical receptors: the same and not the same*, *Curr. Opin. Cell Biol.* 14 (2002) 189–195. doi:10.1016/S0955-0674(02)00306-X.
- [71] K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C.A. Behnke, H. Motoshima, B.A. Fox, I. Le Trong, D.C. Teller, T. Okada, R.E. Stenkamp, M. Yamamoto, M. Miyano, *Crystal structure of*

- rhodopsin: A G protein-coupled receptor.*, Science. 289 (2000) 739–745.  
doi:10.1126/science.1150609.
- [72] J.B. Findlay, D.J. Pappin, *The opsin family of proteins.*, Biochem. J. 238 (1986) 625–42.
- [73] M. Ishiguro, *Conformation analysis of glu181 and ser186 in the metarhodopsin I state.*, Chembiochem. 5 (2004) 1204–9. doi:10.1002/cbic.200400034.
- [74] M.N. Sandberg, J.A. Greco, N.L. Wagner, T.L. Amora, L.A. Ramos, M. Chen, B.E. Knox, R.R. Birge, *Low-Temperature Trapping of Photointermediates of the Rhodopsin E181Q Mutant.*, SOJ Biochem. 1 (2015) 1–23.
- [75] S. Ahuja, V. Hornak, E.C.Y. Yan, N. Syrett, J. a Goncalves, A. Hirshfeld, M. Ziliox, T.P. Sakmar, M. Sheves, P.J. Reeves, S.O. Smith, M. Eilers, *Helix movement is coupled to displacement of the second extracellular loop in rhodopsin activation.*, Nat. Struct. Mol. Biol. 16 (2009) 168–75. doi:10.1038/nsmb.1549.
- [76] M. Eilers, J. a Goncalves, S. Ahuja, C. Kirkup, A. Hirshfeld, C. Simmerling, P.J. Reeves, M. Sheves, S.O. Smith, *Structural transitions of transmembrane helix 6 in the formation of metarhodopsin I.*, J. Phys. Chem. B. 116 (2012) 10477–89. doi:10.1021/jp3019183.
- [77] J.A. Goncalves, K. South, S. Ahuja, E. Zaitseva, C.A. Opefi, M. Eilers, R. Vogel, P.J. Reeves, S.O. Smith, *Highly conserved tyrosine stabilizes the active state of rhodopsin.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107 (2010) 19861–6. doi:10.1073/pnas.1009405107.
- [78] K. Fahmy, T.P. Sakmar, *Regulation of the rhodopsin-transducin interaction by a highly conserved carboxylic acid group.*, Biochemistry. 32 (1993) 7229–36.
- [79] E. Ramon, A. Cordoní, L. Bosch, E.Y. Zernii, I.I. Senin, J. Manyosa, P.P. Philippov, J.J. Pérez, P. Garriga, *Critical role of electrostatic interactions of amino acids at the cytoplasmic region of helices 3 and 6 in rhodopsin conformational properties and activation.*, J. Biol. Chem. 282 (2007) 14272–82. doi:10.1074/jbc.M611091200.
- [80] A. Cordoní, E. Ramon, P. Garriga, J.J. Perez, *Molecular dynamics simulations of rhodopsin point mutants at the cytoplasmic side of helices 3 and 6.*, J. Biomol. Struct. Dyn. 25 (2008) 573–87. doi:10.1080/07391102.2008.10507204.
- [81] K.P. Hofmann, P. Scheerer, P.W. Hildebrand, H.-W. Choe, J.H. Park, M. Heck, O.P. Ernst, *A G protein-coupled receptor at work: the rhodopsin model.*, Trends Biochem. Sci. 34 (2009) 540–52. doi:10.1016/j.tibs.2009.07.005.
- [82] H.-W. Choe, Y.J. Kim, J.H. Park, T. Morizumi, E.F. Pai, N. Krauss, K.P. Hofmann, P. Scheerer, O.P. Ernst, *Crystal structure of metarhodopsin II.*, Nature. 471 (2011) 651–5. doi:10.1038/nature09789.
- [83] O. Fritze, S. Filipek, V. Kuksa, K. Palczewski, K.P. Hofmann, O.P. Ernst, *Role of the conserved NPxxY(x)5,6F motif in the rhodopsin ground state and during activation.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100 (2003) 2290–5. doi:10.1073/pnas.0435715100.
- [84] J. Li, P.C. Edwards, M. Burghammer, C. Villa, G.F.X. Schertler, *Structure of bovine rhodopsin in a trigonal crystal form.*, J. Mol. Biol. 343 (2004) 1409–38. doi:10.1016/j.jmb.2004.08.090.
- [85] P. Scheerer, J.H. Park, P.W. Hildebrand, Y.J. Kim, N. Krauss, H.-W. Choe, K.P. Hofmann, O.P. Ernst, *Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation.*, Nature. 455 (2008) 497–502. doi:10.1038/nature07330.
- [86] T.E. Angel, S. Gupta, B. Jastrzebska, K. Palczewski, M.R. Chance, *Structural waters define a functional channel mediating activation of the GPCR, rhodopsin.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106 (2009) 14367–14372. doi:10.1073/pnas.0901074106.
- [87] T.E. Angel, M.R. Chance, K. Palczewski, *Conserved waters mediate structural and functional activation of family A (rhodopsin-like) G protein-coupled receptors.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106 (2009) 8555–60. doi:10.1073/pnas.0903545106.
- [88] A. Grossfield, M.C. Pitman, S.E. Feller, O. Soubias, K. Gawrisch, *Internal hydration increases during activation of the G-protein-coupled receptor rhodopsin.*, J. Mol. Biol. 381 (2008) 478–86. doi:10.1016/j.jmb.2008.05.036.

- [89] D.C. Mitchell, B.J. Litman, *Effect of protein hydration on receptor conformation: decreased levels of bound water promote metarhodopsin II formation.*, Biochemistry. 38 (1999) 7617–23. doi:10.1021/bi990634m.
- [90] S. Nishimura, H. Kandori, A. Maeda, *Transmembrane Signaling Mediated by Water in Bovine Rhodopsin*, Photochem. Photobiol. 66 (1997) 796–801. doi:10.1111/j.1751-1097.1997.tb03227.x.
- [91] X. Sun, H. Ågren, Y. Tu, *Functional water molecules in rhodopsin activation.*, J. Phys. Chem. B. 118 (2014) 10863–73. doi:10.1021/jp505180t.
- [92] G. Fenalti, P.M. Giguere, V. Katritch, X.-P. Huang, A. a Thompson, V. Cherezov, B.L. Roth, R.C. Stevens, *Molecular control of  $\delta$ -opioid receptor signalling.*, Nature. 506 (2014) 191–6. doi:10.1038/nature12944.
- [93] W. Liu, E. Chun, A.A. Thompson, P. Chubukov, F. Xu, V. Katritch, G.W. Han, C.B. Roth, L.H. Heitman, A.P. IJzerman, V. Cherezov, R.C. Stevens, *Structural basis for allosteric regulation of GPCRs by sodium ions.*, Science. 337 (2012) 232–6. doi:10.1126/science.1219218.
- [94] S. Yuan, S. Filipek, K. Palczewski, H. Vogel, *Activation of G-protein-coupled receptors correlates with the formation of a continuous internal water pathway.*, Nat. Commun. 5 (2014) 4733. doi:10.1038/ncomms5733.
- [95] D. Voet, J.G. Voet, *Biochemistry*, Wiley & sons, 2004.
- [96] T. Okada, M. Sugihara, A.-N. Bondar, M. Elstner, P. Entel, V. Buss, *The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 Å crystal structure.*, J. Mol. Biol. 342 (2004) 571–83. doi:10.1016/j.jmb.2004.07.044.
- [97] D.L. Farrens, C. Altenbach, K. Yang, W.L. Hubbell, H.G. Khorana, *Requirement of Rigid-Body Motion of Transmembrane Helices for Light Activation of Rhodopsin*, Science (80-. ). 274 (1996) 768–770. doi:10.1126/science.274.5288.768.
- [98] C. Altenbach, A.K. Kusnetzow, O.P. Ernst, K.P. Hofmann, W.L. Hubbell, *High-resolution distance mapping in rhodopsin reveals the pattern of helix movement due to activation.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105 (2008) 7439–44. doi:10.1073/pnas.0802515105.
- [99] X. Deupi, P. Edwards, A. Singhal, B. Nickle, D. Oprian, G. Schertler, J. Standfuss, *Stabilized G protein binding site in the structure of constitutively active metarhodopsin-II.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109 (2012) 119–24. doi:10.1073/pnas.1114089108.
- [100] S. Ye, E. Zaitseva, G. Caltabiano, G.F.X. Schertler, T.P. Sakmar, X. Deupi, R. Vogel, *Tracking G-protein-coupled receptor activation using genetically encoded infrared probes*, Nature. 464 (2010) 1386–1389. doi:10.1038/nature08948.
- [101] M. Han, S.O. Smith, T.P. Sakmar, *Constitutive activation of opsin by mutation of methionine 257 on transmembrane helix 6.*, Biochemistry. 37 (1998) 8253–61. doi:10.1021/bi980147r.
- [102] J.S. Frähmcke, M. Wanko, P. Phatak, M.A. Mroginiski, M. Elstner, *The protonation state of Glu181 in rhodopsin revisited: interpretation of experimental data on the basis of QM/MM calculations.*, J. Phys. Chem. B. 114 (2010) 11338–52. doi:10.1021/jp104537w.
- [103] M.R. Lewis, M. Kono, *Rhodopsin deactivation is affected by mutations of Tyr191.*, Photochem. Photobiol. 82 (2006) 1442–6. doi:10.1562/2006-02-20-RA-804.
- [104] R. Vogel, F. Siebert, G. Mathias, P. Tavan, G. Fan, M. Sheves, *Deactivation of rhodopsin in the transition from the signaling state meta II to meta III involves a thermal isomerization of the retinal chromophore C[double bond]D.*, Biochemistry. 42 (2003) 9863–74. doi:10.1021/bi034684+.
- [105] E. Ritter, M. Elgeti, K.P. Hofmann, F.J. Bartl, *Deactivation and proton transfer in light-induced metarhodopsin II/metarhodopsin III conversion: a time-resolved fourier transform infrared spectroscopic study.*, J. Biol. Chem. 282 (2007) 10720–30. doi:10.1074/jbc.M610658200.
- [106] T. Doi, R.S. Molday, H.G. Khorana, *Role of the intradiscal domain in rhodopsin assembly and function.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87 (1990) 4991–5.

- [107] E. Ramon, J. Marron, L. del Valle, L. Bosch, A. Andrés, J. Manyosa, P. Garriga, *Effect of dodecyl maltoside detergent on rhodopsin stability and function.*, Vision Res. 43 (2003) 3055–61. doi:10.1016/j.visres.2003.08.009.
- [108] K. Sakai, Y. Imamoto, T. Yamashita, Y. Shichida, *Functional analysis of the second extracellular loop of rhodopsin by characterizing split variants.*, Photochem. Photobiol. Sci. 9 (2010) 1490–7. doi:10.1039/c0pp00183j.
- [109] J.E. Kim, D. Pan, R.A. Mathies, *Picosecond dynamics of G-protein coupled receptor activation in rhodopsin from time-resolved UV resonance Raman spectroscopy.*, Biochemistry. 42 (2003) 5169–75. doi:10.1021/bi030026d.
- [110] J.M. Janz, D.L. Farrens, *Role of the retinal hydrogen bond network in rhodopsin Schiff base stability and hydrolysis.*, J. Biol. Chem. 279 (2004) 55886–94. doi:10.1074/jbc.M408766200.
- [111] E.C.Y. Yan, M.A. Kazmi, S. De, B.S.W. Chang, C. Seibert, E.P. Marin, R.A. Mathies, T.P. Sakmar, *Function of extracellular loop 2 in rhodopsin: glutamic acid 181 modulates stability and absorption wavelength of metarhodopsin II.*, Biochemistry. 41 (2002) 3620–7.
- [112] S. Madabushi, A.K. Gross, A. Philippi, E.C. Meng, T.G. Wensel, O. Lichtarge, *Evolutionary trace of G protein-coupled receptors reveals clusters of residues that determine global and class-specific functions.*, J. Biol. Chem. 279 (2004) 8126–32. doi:10.1074/jbc.M312671200.
- [113] T.W. Schwartz, T.M. Frimurer, B. Holst, M.M. Rosenkilde, C.E. Elling, *Molecular mechanism of 7TM receptor activation—a global toggle switch model.*, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 46 (2006) 481–519. doi:10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141218.
- [114] T.D. Dunham, D.L. Farrens, *Conformational changes in rhodopsin. Movement of helix f detected by site-specific chemical labeling and fluorescence spectroscopy.*, J. Biol. Chem. 274 (1999) 1683–90. doi:10.1074/jbc.274.3.1683.
- [115] J.W. Lewis, F.J. van Kuijk, T.E. Thorgeirsson, D.S. Kliger, *Photolysis intermediates of human rhodopsin.*, Biochemistry. 30 (1991) 11372–6.
- [116] C. Baumann, S. Bender, *Kinetics of rhodopsin bleaching in the isolated human retina.*, J. Physiol. 235 (1973) 761–73.
- [117] J.M. Sullivan, P. Shukla, *Time-resolved rhodopsin activation currents in a unicellular expression system.*, Biophys. J. 77 (1999) 1333–57. doi:10.1016/S0006-3495(99)76983-3.
- [118] P. Shukla, *Normal and Mutant Rhodopsin Activation Measured with the Early Receptor Current in a Unicellular Expression System*, J. Gen. Physiol. 114 (1999) 609–636. doi:10.1085/jgp.114.5.609.
- [119] C. Klammt, D. Schwarz, F. Löhr, B. Schneider, V. Dötsch, F. Bernhard, *Cell-free expression as an emerging technique for the large scale production of integral membrane protein.*, FEBS J. 273 (2006) 4141–53. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05432.x.
- [120] J. Nathans, D.S. Hogness, *Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding human rhodopsin.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81 (1984) 4851–5.
- [121] P.J.R. Spooner, J.M. Sharples, S.C. Goodall, P.H.M. Bovee-Geurts, M.A. Verhoeven, J. Lugtenburg, A.M.A. Pistorius, W.J. Degrip, A. Watts, *The ring of the rhodopsin chromophore in a hydrophobic activation switch within the binding pocket.*, J. Mol. Biol. 343 (2004) 719–30. doi:10.1016/j.jmb.2004.08.049.
- [122] M. Zalewska, M. Siara, W. Sajewicz, *G protein-coupled receptors: abnormalities in signal transmission, disease states and pharmacotherapy.*, Acta Pol. Pharm. 71 (2014) 229–43.
- [123] C.H. Sung, C.M. Davenport, J. Nathans, *Rhodopsin mutations responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa. Clustering of functional classes along the polypeptide chain.*, J. Biol. Chem. 268 (1993) 26645–9.

- [124] E.P. Rakoczy, C. Kiel, R. McKeone, F. Stricher, L. Serrano, *Analysis of disease-linked rhodopsin mutations based on structure, function, and protein stability calculations.*, J. Mol. Biol. 405 (2011) 584–606. doi:10.1016/j.jmb.2010.11.003.
- [125] F. Chan, A. Bradley, T.G. Wensel, J.H. Wilson, *Knock-in human rhodopsin-GFP fusions as mouse models for human disease and targets for gene therapy.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101 (2004) 9109–9114. doi:10.1073/pnas.0403149101.
- [126] A. Singhal, M.K. Ostermaier, S. a Vishnivetskiy, V. Panneels, K.T. Homan, J.J.G. Tesmer, D. Veprintsev, X. Deupi, V. V Gurevich, G.F.X. Schertler, J. Standfuss, *Insights into congenital stationary night blindness based on the structure of G90D rhodopsin.*, EMBO Rep. 14 (2013) 520–6. doi:10.1038/embor.2013.44.
- [127] R.E. Anderson, M.B. Maude, *Lipids of ocular tissues. 6. Phospholipids of bovine rod outer segments*, Biochemistry. 9 (1970) 3624–3628. doi:10.1021/bi00820a019.
- [128] J. Epps, J.W. Lewis, I. Szundi, D.S. Kliger, *Lumi I --> Lumi II: the last detergent independent process in rhodopsin photoexcitation.*, Photochem. Photobiol. 82 (2006) 1436–41. doi:10.1562/2006-02-01-RA-792.
- [129] D.S. Papermaster, *Preparation of retinal rod outer segments.*, Methods Enzymol. 81 (1982) 48–52.
- [130] M. Elgeti, E. Ritter, F.J. Bartl, *New Insights into Light-Induced Deactivation of Active Rhodopsin by SVD and Global Analysis of Time-Resolved UV/Vis- and FTIR-Data*, Zeitschrift Für Phys. Chemie. 222 (2008) 1117–1129. doi:10.1524/zpch.2008.5392.
- [131] Rhodopsin sequence Ovis aries, <http://www.uniprot.org/uniprot/P02700>.
- [132] Y. Jiang, M. Xie, W. Chen, R. Talbot, J.F. Maddox, T. Faraut, C. Wu, D.M. Muzny, Y. Li, W. Zhang et al., *The sheep genome illuminates biology of the rumen and lipid metabolism.*, Science. 344 (2014) 1168–73. doi:10.1126/science.1252806.
- [133] J. Gronholz, W. Herres, *Understanding FT-IR Data Processing*, Repr. Vols. 1-3 (1985) 1–21.
- [134] A. Barth, *Infrared spectroscopy of proteins*, Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg. 1767 (2007) 1073–1101. doi:10.1016/j.bbabi.2007.06.004.
- [135] F. DeLange, C.H. Klaassen, S.E. Wallace-Williams, P.H. Bovee-Geurts, X.M. Liu, W.J. DeGrip, K.J. Rothschild, *Tyrosine structural changes detected during the photoactivation of rhodopsin.*, J. Biol. Chem. 273 (1998) 23735–9.
- [136] I. Palings, E.M. van den Berg, J. Lugtenburg, R.A. Mathies, *Complete assignment of the hydrogen out-of-plane wagging vibrations of bathorhodopsin: chromophore structure and energy storage in the primary photoproduct of vision.*, Biochemistry. 28 (1989) 1498–1507. doi:10.1021/bi00430a012.
- [137] Y. Furutani, H. Kandori, Y. Shichida, *Structural changes in lumirhodopsin and metarhodopsin I studied by their photoreactions at 77 K*, Biochemistry. 42 (2003) 8494–8500. doi:10.1021/bi034438y.
- [138] V. Kuksa, F. Bartl, T. Maeda, G.-F. Jang, E. Ritter, M. Heck, J.P. Van Hooser, Y. Liang, S. Filipek, M.H. Gelb, K.P. Hofmann, K. Palczewski, *Biochemical and physiological properties of rhodopsin regenerated with 11-cis-6-ring- and 7-ring-retinals.*, J. Biol. Chem. 277 (2002) 42315–24. doi:10.1074/jbc.M206014200.
- [139] F.J. Bartl, O. Fritze, E. Ritter, R. Herrmann, V. Kuksa, K. Palczewski, K.P. Hofmann, O.P. Ernst, *Partial agonism in a G Protein-coupled receptor: role of the retinal ring structure in rhodopsin activation.*, J. Biol. Chem. 280 (2005) 34259–67. doi:10.1074/jbc.M505260200.
- [140] R. Vogel, F. Siebert, E.C.Y. Yan, T.P. Sakmar, A. Hirshfeld, M. Sheves, *Modulating rhodopsin receptor activation by altering the pKa of the retinal Schiff base.*, J. Am. Chem. Soc. 128 (2006) 10503–12. doi:10.1021/ja0627848.
- [141] R. Vogel, S. Lüdeke, F. Siebert, T.P. Sakmar, A. Hirshfeld, M. Sheves, *Agonists and partial agonists of rhodopsin: retinal polyene methylation affects receptor activation.*, Biochemistry. 45 (2006) 1640–52. doi:10.1021/bi052196r.

- [142] M. Szczepek, F. Beyrière, K.P. Hofmann, M. Elgeti, R. Kazmin, A. Rose, F.J. Bartl, D. von Stetten, M. Heck, M.E. Sommer, P.W. Hildebrand, P. Scheerer, *Crystal structure of a common GPCR-binding interface for G protein and arrestin.*, Nat. Commun. 5 (2014) 4801. doi:10.1038/ncomms5801.
- [143] R. Vogel, S. Martell, M. Mahalingam, M. Engelhard, F. Siebert, *Interaction of a G protein-coupled receptor with a G protein-derived peptide induces structural changes in both peptide and receptor: a Fourier-transform infrared study using isotopically labeled peptides.*, J. Mol. Biol. 366 (2007) 1580–8. doi:10.1016/j.jmb.2006.12.019.
- [144] F. Siebert, W. Mäntele, K. Gerwert, *Fourier-transform infrared spectroscopy applied to rhodopsin. The problem of the protonation state of the retinylidene Schiff base re-investigated.*, Eur. J. Biochem. 136 (1983) 119–127. doi:10.1111/j.1432-1033.1983.tb07714.x.
- [145] A. Schleicher, H. Kühn, K.P. Hofmann, *Kinetics, binding constant, and activation energy of the 48-kDa protein-rhodopsin complex by extra-metarhodopsin II.*, Biochemistry. 28 (1989) 1770–1775. doi:10.1021/bi00430a052.
- [146] Matlab, version 7.11.1 (R2010b) sp1, [www.mathworks.com/products/matlab/](http://www.mathworks.com/products/matlab/).
- [147] PyMOL, version 1.2r2, <http://www.pymol.org>.
- [148] A.C. Wallace, R.A. Laskowski, J.M. Thornton, *LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions*, "Protein Eng. Des. Sel. 8 (1995) 127–134. doi:10.1093/protein/8.2.127.
- [149] R.A. Laskowski, M.B. Swindells, *LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery.*, J. Chem. Inf. Model. 51 (2011) 2778–86. doi:10.1021/ci200227u.
- [150] Marvin, Calculator Plugin, <http://www.chemaxon.com/marvin/sketch/index.php>.
- [151] G.E. Crooks, G. Hon, J. Chandonia, S.E. Brenner, *WebLogo: a sequence logo generator.*, Genome Res. 14 (2004) 1188–90. doi:10.1101/gr.849004.
- [152] A.M. Waterhouse, J.B. Procter, D.M. a Martin, M. Clamp, G.J. Barton, *Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench.*, Bioinformatics. 25 (2009) 1189–91. doi:10.1093/bioinformatics/btp033.
- [153] Inkscape, version 048.5, <https://inkscape.org>.
- [154] Mendeley\_Desktop, version 1.13.5, <http://www.mendeley.com/>.
- [155] B. Nie, J. Stutzman, A. Xie, *A vibrational spectral maker for probing the hydrogen-bonding status of protonated Asp and Glu residues.*, Biophys. J. 88 (2005) 2833–47. doi:10.1529/biophysj.104.047639.
- [156] J.H. Parkes, P.A. Liebman, *Temperature and pH dependence of the metarhodopsin I-metarhodopsin II kinetics and equilibria in bovine rod disk membrane suspensions.*, Biochemistry. 23 (1984) 5054–5061. doi:10.1021/bi00316a035.
- [157] M. Beck, F. Siebert, T.P. Sakmar, *Evidence for the specific interaction of a lipid molecule with rhodopsin which is altered in the transition to the active state metarhodopsin II*, FEBS Lett. 436 (1998) 304–308. doi:10.1016/S0014-5793(98)01156-9.
- [158] J.W. Lewis, I. Szundi, M.A. Kazmi, T.P. Sakmar, D.S. Kliger, *Proton movement and photointermediate kinetics in rhodopsin mutants.*, Biochemistry. 45 (2006) 5430–9. doi:10.1021/bi0525775.
- [159] D. Hoersch, H. Otto, I. Wallat, M.P. Heyn, *Monitoring the conformational changes of photoactivated rhodopsin from microseconds to seconds by transient fluorescence spectroscopy*, Biochemistry. 47 (2008) 11518–11527. doi:10.1021/bi801397e.
- [160] M. Elgeti, A.S. Rose, F.J. Bartl, P.W. Hildebrand, K.-P. Hofmann, M. Heck, *Precision vs flexibility in GPCR signaling.*, J. Am. Chem. Soc. 135 (2013) 12305–12. doi:10.1021/ja405133k.
- [161] S. Nishimura, H. Kandori, A. Maeda, *Interaction between photoactivated rhodopsin and the C-terminal peptide of transducin alpha-subunit studied by FTIR spectroscopy.*, Biochemistry. 37 (1998) 15816–24. doi:10.1021/bi981451n.

- [162] S. Nishimura, J. Sasaki, H. Kandori, T. Matsuda, Y. Fukada, A. Maeda, *Structural changes in the peptide backbone in complex formation between activated rhodopsin and transducin studied by FTIR spectroscopy.*, *Biochemistry*. 35 (1996) 13267–71. doi:10.1021/bi960911e.
- [163] F. Bartl, E. Ritter, K.P. Hofmann, *FTIR spectroscopy of complexes formed between metarhodopsin II and C- terminal peptides from the G-protein  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits*, *FEBS Lett.* 473 (2000) 259–264. doi:10.1016/S0014-5793(00)01544-1.
- [164] E. Malmerberg, P.H. M. Bovee-Geurts, G. Katona, X. Deupi, D. Arnlund, C. Wickstrand, L.C. Johansson, S. Westenhoff, E. Nazarenko, G.F. X. Schertler, A. Menzel, W.J. de Grip, R. Neutze, *Conformational activation of visual rhodopsin in native disc membranes*, *Sci. Signal.* 8 (2015). doi:10.1126/scisignal.2005646.
- [165] H. Nakamichi, T. Okada, *Crystallographic analysis of primary visual photochemistry*, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 45 (2006) 4270–4273. doi:10.1002/anie.200600595.
- [166] H. Nakamichi, T. Okada, *Local peptide movement in the photoreaction intermediate of rhodopsin.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 12729–12734. doi:10.1073/pnas.0601765103.
- [167] S. Ahuja, S.O. Smith, *Multiple switches in G protein-coupled receptor activation.*, *Trends Pharmacol. Sci.* 30 (2009) 494–502. doi:10.1016/j.tips.2009.06.003.
- [168] S. Bhattacharya, S.E. Hall, N. Vaidehi, *Agonist-induced conformational changes in bovine rhodopsin: insight into activation of G-protein-coupled receptors.*, *J. Mol. Biol.* 382 (2008) 539–55. doi:10.1016/j.jmb.2008.06.084.
- [169] J.H. Park, P. Scheerer, K.P. Hofmann, H.-W. Choe, O.P. Ernst, *Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin.*, *Nature*. 454 (2008) 183–7. doi:10.1038/nature07063.
- [170] J. a Ballesteros, X. Deupi, M. Olivella, E.E. Haaksma, L. Pardo, *Serine and threonine residues bend alpha-helices in the  $\chi(1) = g(-)$  conformation.*, *Biophys. J.* 79 (2000) 2754–60. doi:10.1016/S0006-3495(00)76514-3.
- [171] X. Deupi, M. Olivella, C. Govaerts, J.A. Ballesteros, M. Campillo, L. Pardo, *Ser and Thr residues modulate the conformation of pro-kinked transmembrane alpha-helices.*, *Biophys. J.* 86 (2004) 105–15. doi:10.1016/S0006-3495(04)74088-6.
- [172] R.L. Dunbrack, F.E. Cohen, *Bayesian statistical analysis of protein side-chain rotamer preferences.*, *Protein Sci.* 6 (1997) 1661–81. doi:10.1002/pro.5560060807.
- [173] Y. Kong, M. Karplus, *The signaling pathway of rhodopsin.*, *Structure*. 15 (2007) 611–23. doi:10.1016/j.str.2007.04.002.
- [174] K. Rother, P.W. Hildebrand, A. Goede, B. Gruening, R. Preissner, *Voronoia: analyzing packing in protein structures.*, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) D393–5. doi:10.1093/nar/gkn769.
- [175] B. Hess, C. Kutzner, D. Van Der Spoel, E. Lindahl, *GRGMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation*, *J. Chem. Theory Comput.* 4 (2008) 435–447. doi:10.1021/ct700301q.
- [176] A. V Struts, G.F.J. Salgado, M.F. Brown, *Solid-state  $^2\text{H}$  NMR relaxation illuminates functional dynamics of retinal cofactor in membrane activation of rhodopsin.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 8263–8. doi:10.1073/pnas.1014692108.
- [177] W. Kabsch, C. Sander, *Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features.*, *Biopolymers*. 22 (1983) 2577–2637. doi:10.1002/bip.360221211.



## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, den 25.03.2015

---

Roman Kazmin



## DANKSAGUNG

Zuerst und mit dem größten Bedürfnis möchte ich mich bei meiner Familie für ihre langjährige und unschätzbare Unterstützung, die immerwährende Motivation und die Liebe, die sie mir haben zukommen lassen, bedanken.

Die Wahl des interessanten und wichtigen Forschungsthemas verdanke ich meinem Betreuer Prof. Dr. Franz J. Bartl. Er ermöglichte mir die Umsetzung dieser Arbeit, stand mir stets unterstützend und anregend zur Seite und wusste es, mich zu zügeln, wenn ich mich verrannte.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch Dr. Eglof Ritter für dessen schier unerschöpfliches, enormes Fachwissen, das er zu jeder Zeit bereit war, mit mir zu teilen, aber auch für seine Inspiration und Unterstützung bei der Umsetzung neuer Ideen und Richtungen.

Bei meinen Laborkollegen Dr. Matthias Elgeti und Patrick Piwowarski möchte ich mich dafür bedanken, dass über die Jahre des gegenseitigen Ansporns und der Inspiration aus dem kollegialen Verhältnis eine Freundschaft entstanden ist.

Prof. Dr. Klaus-Peter Hofmann, Dr. Patrick Scheerer, Dr. Michal Szczepek und Alexander Rose gebührt mein Dank für die zahlreichen erfolgreichen Kooperationen ebenso wie für die unzähligen Diskussionen und Anregungen.

Meinen ehemaligen Kommilitonen Volker Ißbrücker und Axel Fillingner möchte ich für die Motivation und das gemeinsame Beschreiten des akademischen Pfades herzlichst danken.

Fortschrittliche und richtungweisende Forschung ist ohne technische Assistenten undenkbar. Herzlichen Dank daher auch an Jana Engelmann, Anja Koch und Brian Bauer für ihre wichtige Unterstützung.

Nicht zuletzt soll mein Dank doch auch allen übrigen Mitarbeitern des Instituts für die angenehme Arbeitsatmosphäre gelten. Diese war stets Voraussetzung für gutes Gelingen.